Orsay Série :
N° d'ordre : 1634

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE PARIS XI

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Jean_Marie IMHOFF

ETUDE SUR LES RESIDUS AROMATIQUES DE TROIS PROTEASES PANCREATIQUES (E.C.3.4.21)

soutenue le 21 Avril 1976 devant la Commission d'Examen

M. E. LEDERER	PRESIDENT
M. B. KEIL	EXAMINATEURS
M. J. MONTREUIL	
M. B. RIBADEAU-DUMAS	
M. E. SHECHTER	

Orsay Série :
N° d'ordre :

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE PARIS XI

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Jean-Marie IMHOFF

ETUDE SUR LES RESIDUS AROMATIQUES DE TROIS PROTEASES PANCREATIQUES (E.C.3.4.21)

soutenue le 21 Avril 1976 devant la Commission d'Examen

M. E. LEDERER	PRESIDENT
M. B. KEIL	EXAMINATEURS
M. J. MONTREUIL	
M. B. RIBADEAU-DUMAS	
M. E. SHECHTER	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à Charlotte, Antoine et Pauline .

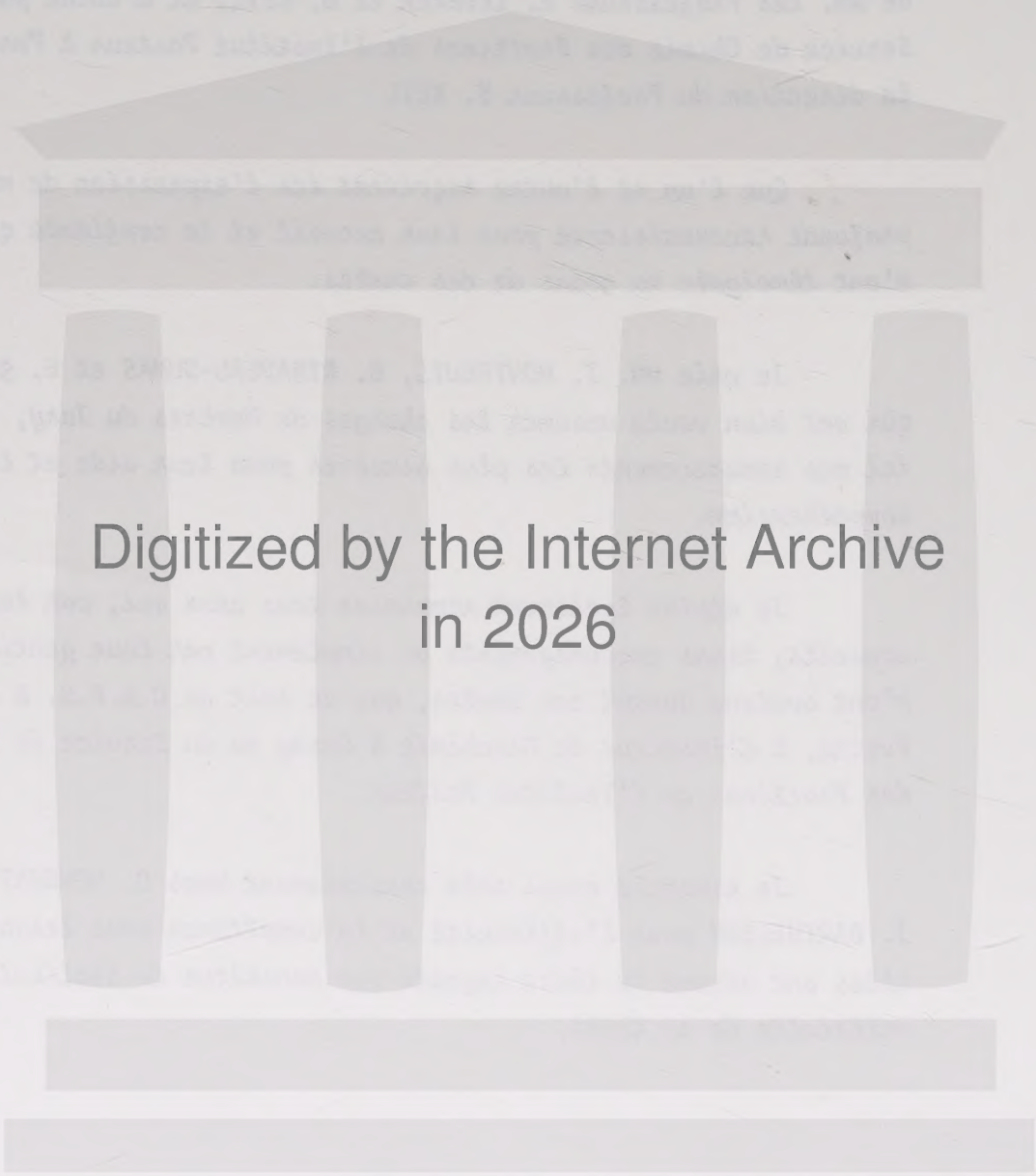
Ce travail a été réalisé, d'une part à l'Institut des Substances Naturelles (C.N.R.S.) à Gif-sur-Yvette sous la direction de MM. les Professeurs E. LEDERER et B. KEIL, et d'autre part au Service de Chimie des Protéines de l'Institut Pasteur à Paris sous la direction du Professeur B. KEIL

Que l'un et l'autre reçoivent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour leur accueil et la confiance qu'ils m'ont témoignée au cours de ces années.

Je prie MM. J. MONTREUIL, B. RIBADEAU-DUMAS et E. SHECHTER qui ont bien voulu assumer les charges de Membres du Jury, de trouver ici mes remerciements les plus sincères pour leur aide et leur compréhension.

Je désire également remercier tous ceux qui, par leurs conseils, leurs encouragements ou simplement par leur gentillesse m'ont soutenu durant ces années, que ce soit au C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette, à l'Institut de Biochimie à Orsay ou au Service de Chimie des Protéines de l'Institut Pasteur.

Je remercie aussi très cordialement Mmes C. GOMBERT et J. BARTHELEMY pour l'efficacité et la compétence avec lesquelles elles ont assumé la tâche ingrate que constitue la réalisation matérielle de ce texte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548120_0014

1. INTRODUCTION GENERALE

1.1. Comparaison de la chymotrypsine, de la trypsine et de l'élastase

1.2. Méthodologie de l'étude de l'influence de la modification chimique d'un résidu d'acide aminé sur l'activité et la structure d'une protéine

1.3. Schéma général

2. METHODES

2.1. Nitration des protéines

2.2. Substitution de la trypsine β et de l'élastase par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle

2.3. Détermination des constantes spectrophotométriques

2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

2.5. Détermination de la composition en acides aminés

2.6. Analyse de l'acide aminé NH_2 terminal

2.7. Identification de la position des résidus tyrosyles nitrés dans la séquence de la chymotrypsine α, du chymotrypsinogène et de la trypsine β

2.8. Identification des résidus tryptophanyles modifiés

2.9. Action de la carboxypeptidase A sur la chymotrypsine α nitrée

2.10. Activation du chymotrypsinogène et du chymotrypsinogène nitré

2.11. Mesure des activités

2.11.1. Titrage du site actif

a) Chymotrypsine

b) Trypsines

2.11.2. Dosage de l'activité vis-à-vis de substrats spécifiques

a) Chymotrypsines

b) Trypsines

c) Elastase

2.12. Stabilité comparée de la chymotrypsine α et de la chymotrypsine α nitrée

2.13. Interaction avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine

2.14. Interaction de la trypsine substituée avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine

2.15. Détermination de la spécificité

a) Chymotrypsines

b) Trypsines

3. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DES RESIDUS TYROSYLES SUR L'ACTIVITE ET LA CONFORMATION DE LA CHYMOTRYPSINE

3.1. Introduction

3.2. Schéma expérimental

3.3. Résultats

3.3.1. Caractérisation du chymotrypsinogène nitré et de la chymotrypsine α nitrée

3.3.2. Identification de la position des tyrosines nitrées

3.3.3. Stabilité des chymotrypsines α et δ nitrées en fonction du pH

3.3.4. Caractéristiques cinétiques des chymotrypsines α et δ nitrées

3.3.5. Interaction de la chymotrypsine α nitrée et de la chymotrypsine δ nitrée, de leurs formes non substituées avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine

3.3.6. Spectres de différence des formes nitrée et native des chymotrypsines α et δ

3.3.7. Comparaison de la spécificité des chymotrypsines α et δ nitrées avec celle des formes natives

3.4. Discussion

4. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DES RESIDUS TYROSYLES DE LA TRYPSINE

4.1. Introduction

4.1.1. Analyse des résultats antérieurs

4.1.2. Réactions parallèles

4.1.3. Schéma expérimental

4.2. Résultats

4.2.1. Cinétiques de nitration et purification de la trypsine β nitrée

4.2.2. Taux de nitration des résidus tyrosyles des trypsines β et commerciale, en présence et en absence de benzamidine

4.2.4. Activités estérasique et protéolytique de la trypsine β nitrée

4.2.5. Spécificité de la trypsine β nitrée

4.3. Discussion

5. SUBSTITUTION DU RESIDU TRYPTOPHANYLE 199 DES TRYPSINES α ET β ET COMPARAISON AVEC L'ELASTASE

5.1. Introduction

5.2. Résultats

5.2.1. Influence de la substitution des tryptophanes par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle sur l'activité enzymatique des trypsines α et β

5.2.2. Essai de substitution de l'élastase par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle

5.2.3. Identification du résidu tryptophanyle substitué dans la trypsine β

5.2.4. Interaction des trypsines substituées avec l'inhibiteur trypsique du pancréas

5.2.5. Essai de substitution du complexe préformé inhibiteur trypsique du pancréas-trypsine

5.2.6. Essai de substitution de la trypsine en présence de benzamidine

5.3. Discussion

6. CONCLUSIONS

7. BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES PUBLICATIONS PRESENTEES DANS LA THESE -

- Functional changes in bovine α and β trypsins caused by the substitution of tryptophan-199
  J.M. IMHOFF, V. KEIL-DLOUHA et B. KEIL
  Biochimie (1973) 55, 521-527

- Reactivity of tryptophyl residues in elastase with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide
  J.M. IMHOFF
  FEBS-Letters (1975) 50, 243-244

- Enzymic properties of nitrated α-chymotrypsin and δ-chymotrypsin
  K.B. SVENSSON, J.M. IMHOFF et B. KEIL
  European Journal of Biochemistry (1975) 58, 493-500

LISTE DES AUTRES TRAVAUX DANS LE DOMAINE DES PROTEINES -

- On the mechanism of the interaction between basic pancreatic trypsin inhibitor and trypsin
  V. KEIL-DLOUHA, J.M. IMHOFF et B. KEIL
  Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, No v. 1970, Walter de GRUYTER, Berlin-New York

- On the complex formation between basic pancreatic trypsin inhibitor and TLCK-, TPCK-derivatives of β-trypsin
  J.M. IMHOFF et V. KEIL-DLOUHA
  FEBS-Letters (1971) 12, 345-348

- Proteolytic activity of pseudo-trypsin
  V. KEIL-DLOUHA, N. ZYLBER, J.M. IMHOFF, N.T. TONG et B. KEIL
  FEBS-Letters (1971) 16, 291-295

- Localization and Biochemical Characterization of Pharyngeal Protease in the polychaetous Annelid *Glycera convoluta*
  C. MICHEL et J.M. IMHOFF
  Marine Biology (1975) 32, 343-347.

1 - Introduction générale

1. INTRODUCTION

Nous présenterons, ici, une comparaison schématique des trois enzymes étudiées : chymotrypsine, trypsine et élastase (E.C.3.4.21). Les propriétés individuelles de chacune des enzymes seront plus amplement détaillées dans le chapitre qui leur sera consacré, puis nous envisagerons les différents aspects liés aux modifications chimiques de résidus d'acides aminés au sein d'une protéine, qui seront suivis par l'exposé de la ligne directrice de notre étude.

1.1. Comparaison de la chymotrypsine, de la trypsine et de l'élastase

Ces enzymes font partie du groupe dit des protéases à sérine, terme utilisé pour désigner les enzymes protéolytiques possédant un résidu séryle actif indispensable à la catalyse enzymatique.

L'établissement des structures primaires de la chymotrypsine (MIKES et Coll. 1966) et de la trypsine (WALSH et Coll. 1964), a permis à KEIL et Coll. (1968) d'établir une hypothèse de similitude tertiaire de la chymotrypsine, déterminée par étude aux rayons X (BLOW et Coll. 1967).

Cette hypothèse d'homologie de structures a été confirmée par l'étude de la conformation de la trypsine cristalline par STROUD et Coll. (1974), et BODE et SCHWAGER (1975). Selon ces derniers auteurs, il n'existe pas de différence notable de structure entre la chymotrypsine et la trypsine.

La figure 1 représente la structure tertiaire de la chymotrypsine α d'après SIGLER et Coll. (1968). La conformation tridimensionnelle de la trypsine en diffère principalement par l'absence de coupure de la chaîne C (extrémités NH_3^+(C) et COO^-(B) liées par une liaison peptidique). La similitude des structures pourra être constatée , figure 4, p.10 d'après l'hypothèse de KEIL et Coll. (1968) et comparée à la figure 1.

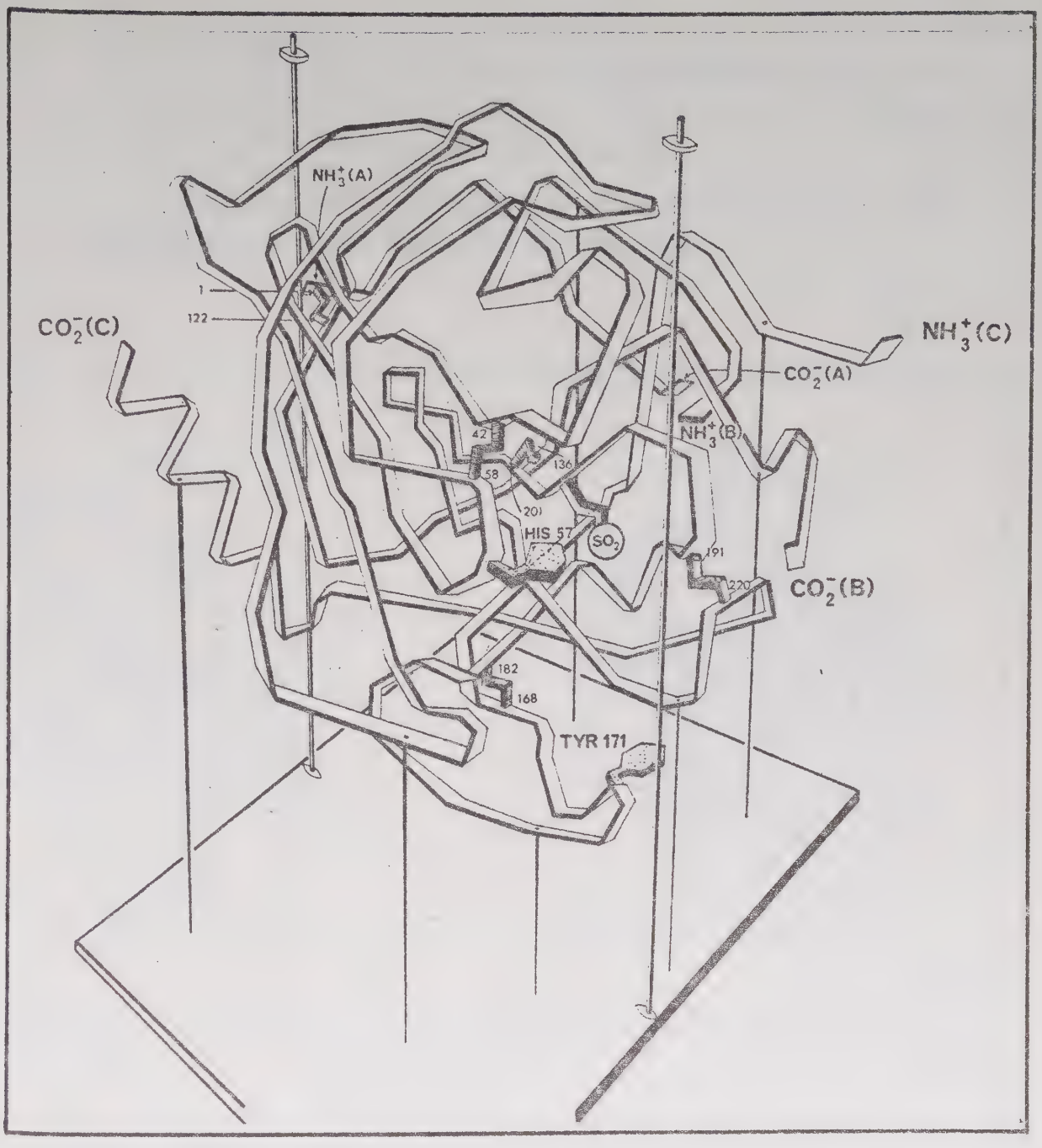


Fig. 1 - Structure cristalline de la chymotrypsine α
d'après SIGLER et Coll. (1968)

Parallèlement, les études cristallographiques aux rayons X de l'élastase par SHOTTON et HARTLEY (1970) ont permis la comparaison de cette enzyme à la chymotrypsine (fig. 2).

Pour ces trois protéases, 30 % des résidus sont dans des positions identiques (HARTLEY et SHOTTON 1971).

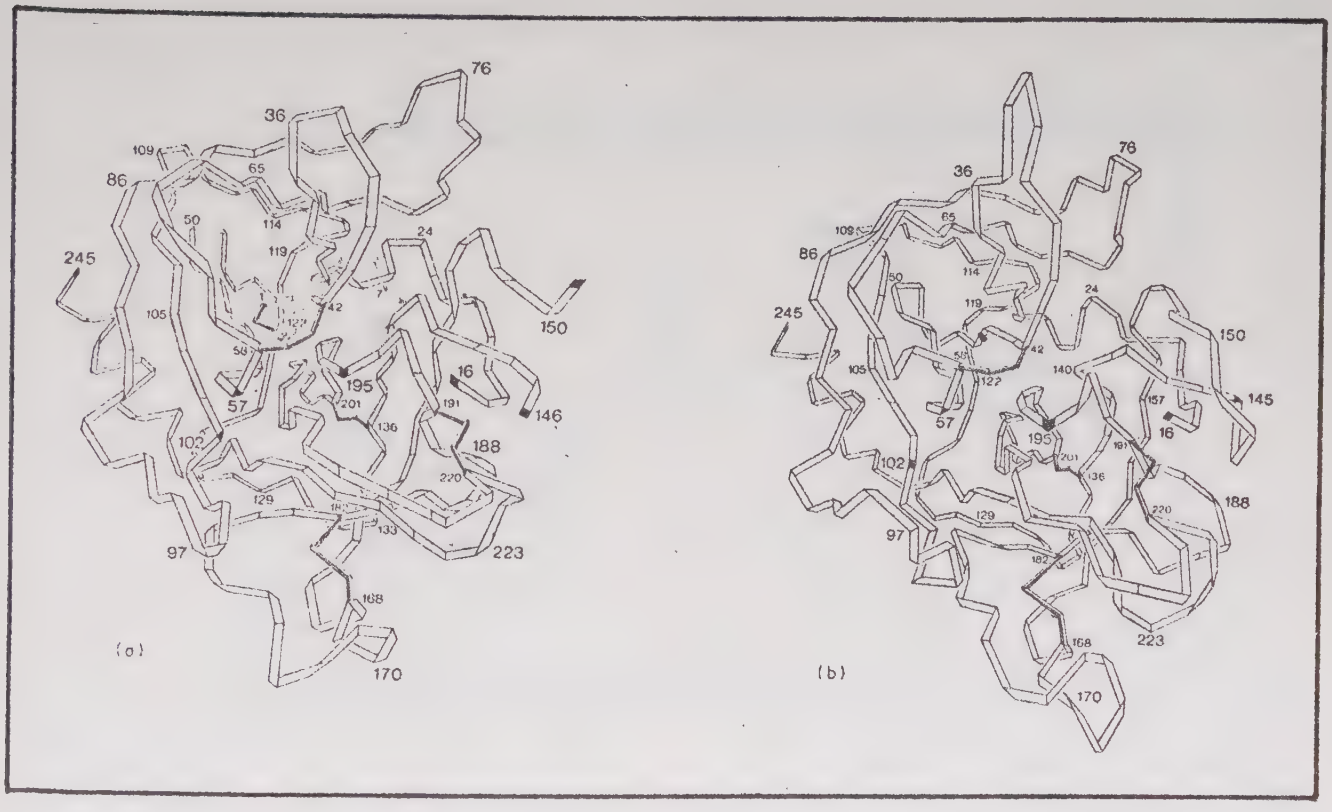


Fig. 2 - Conformations de a) chymotrypsine b) élastase d'après HARTLEY et SHOTTON (1971)

Nous ne rappellerons les principales homologies ou différences que dans les cas de la trypsine et la chymotrypsine, l'élastase n'ayant servi que comme terme de comparaison pour ces deux enzymes.

Sur les 223 résidus d'acides aminés de la trypsine, 98, c'est-à-dire 44 %, occupent des positions identiques à celles de la chymotrypsine α composée de 241 résidus. Quatre des ponts disulfures sur cinq pour la chymotrypsine et six pour la trypsine occupent des

positions semblables (KEIL et Coll. 1968).

Les acides aminés impliqués dans le site actif, portés par des régions différentes de la chaîne polypeptidique, se trouvent rapprochés de manière identique dans les deux enzymes. La figure 3 indique les relations entre les acides aminés impliqués dans le site actif de la chymotrypsine α. La représentation sera identique pour la trypsine, seule la numérotation des résidus sera différente.

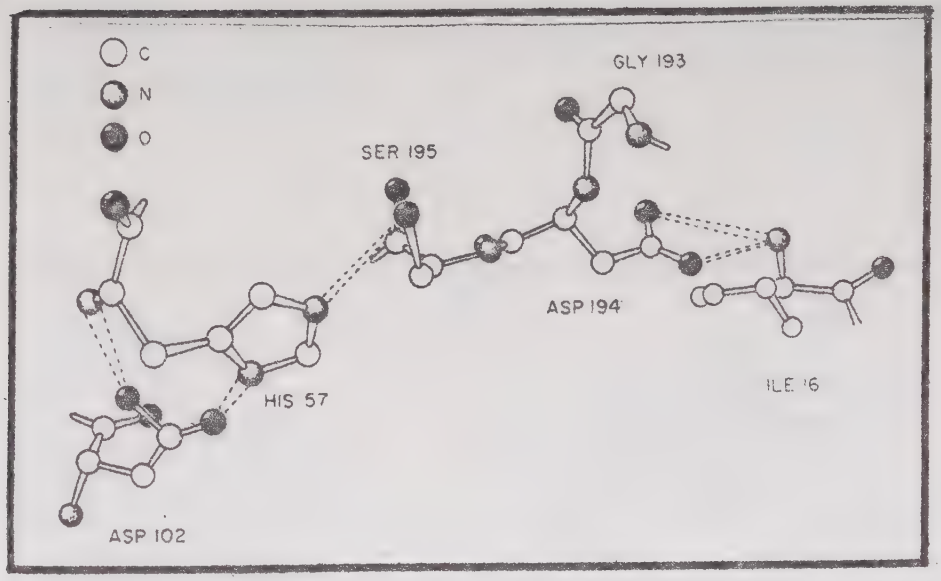


Fig. 3 - Site actif de la chymotrypsine α d'après STEITZ (1969)

Les résidus aspartyle 102, histidyle 57 et séryle 195 pour la chymotrypsine α, aspartyle 90, histidyle 46 et séryle 183 pour la trypsine peuvent former des liaisons hydrogènes entre eux ; les N-H du cycle de l'histidine forment le pont entre l'oxygène ($O\delta^2$) du résidu séryle et l'oxygène ($O\delta^2$) du résidu aspartyle, ainsi qu'ont pu le postuler STEITZ (1969) et STROUD (1974) respectivement pour la chymotrypsine α et la trypsine.

La plupart des zones dont la composition en acides aminés est identique se trouvent, dans les deux cas, dans le voisinage

immédiat des centres actifs, ce qui suppose une invariabilité relative de ces deux enzymes.

De même, la majorité des résidus d'acides aminés porteurs de charges se trouvent à la surface de la molécule alors que les résidus hydrophobes sont, pour la plupart, à l'intérieur.

La distribution des résidus aromatiques diffère entre les deux enzymes quoique la somme en soit identique : 17 résidus pour la chymotrypsine et pour la trypsine.

Les emplacements des résidus tyrosyles et tryptophanyles sont indiqués par des flèches sur les figures 4 et 5 représentant les conformations comparables de la chymotrypsine α et de la trypsine. (Les numéros des résidus en position homologue dans la structure primaire sont encadrés).

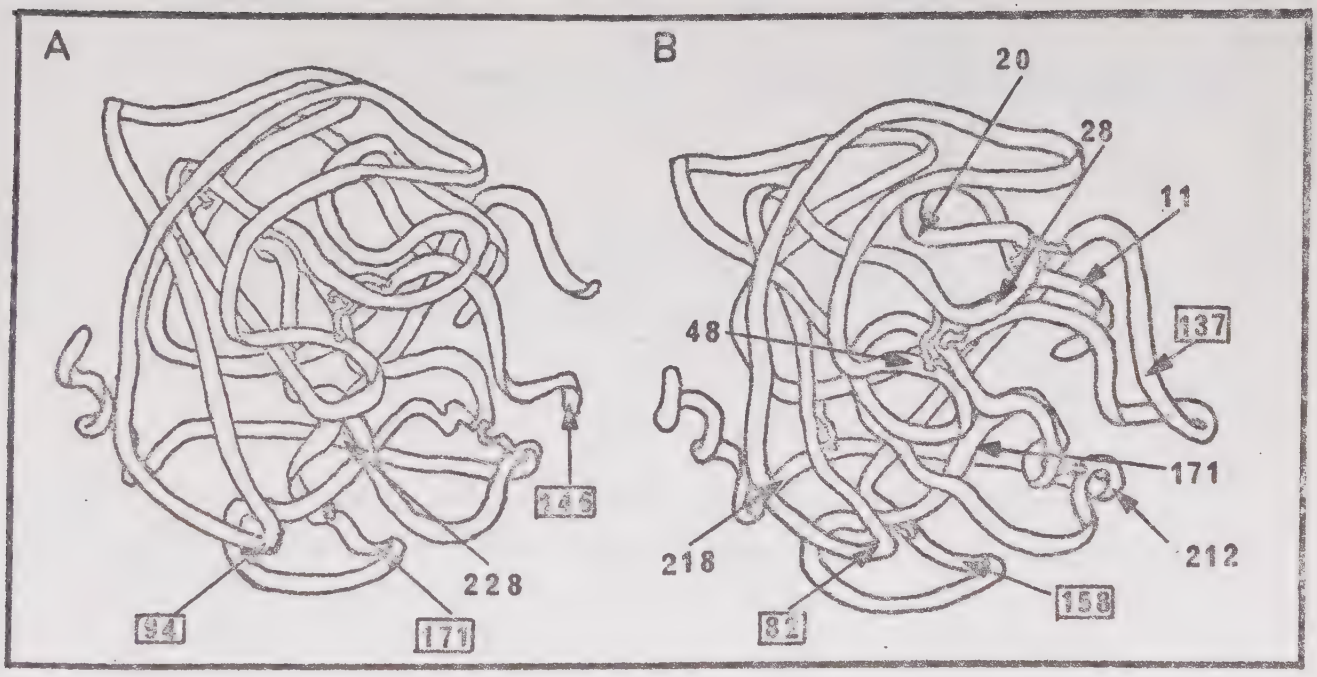


Fig. 4 - Emplacement des résidus tyrosyles dans la chymotrypsine α (A) et la trypsine (B)

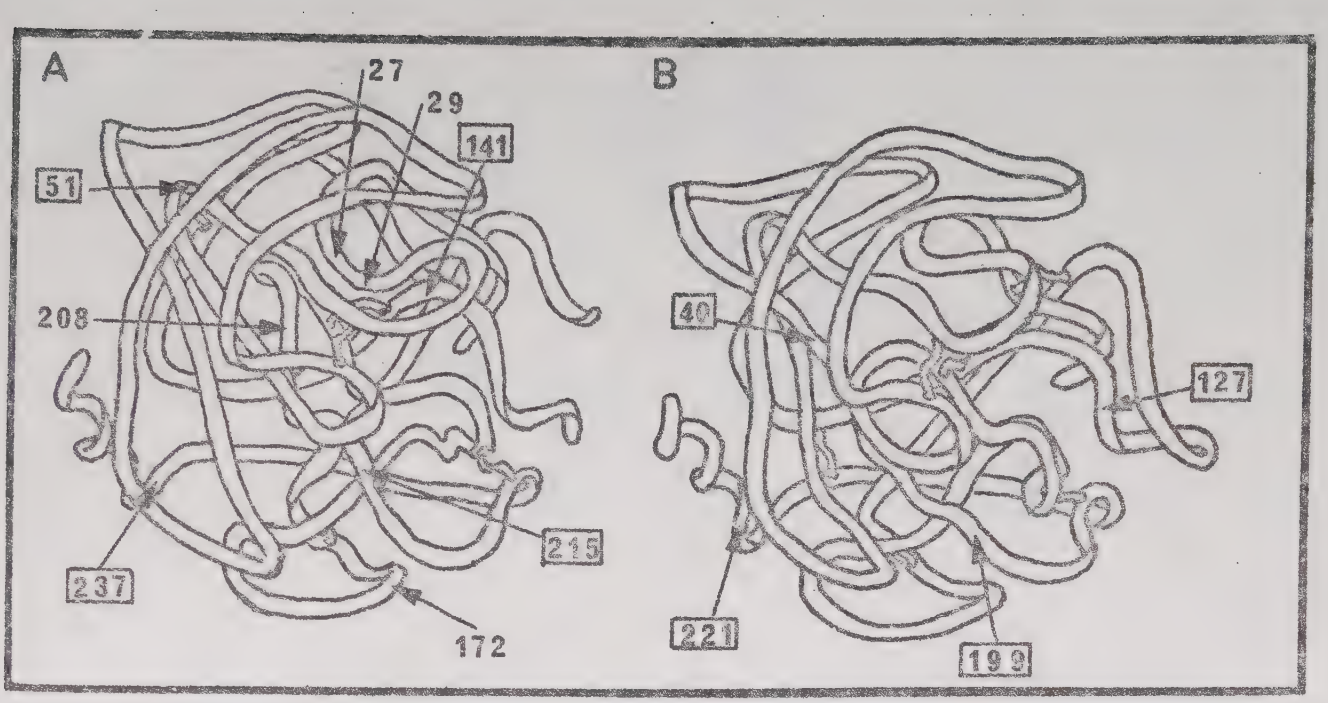


Fig. 5 - Emplacement des résidus tryptophanyles dans la chymotrypsine α (A) et la trypsine (B)

Cependant, les principales différences entre trypsine et chymotrypsine résident dans leur aptitude à fixer spécifiquement pour différentes chaînes latérales de résidus d'acides aminés du côté N-terminal de la liaison qui est coupée par la catalyse :

- La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles sont liés, par leur groupement carbonyle, les résidus arginyle et lysyle.
- La chymotrypsine α hydrolyse les liaisons où sont, de la même façon, impliqués de préférence des résidus aromatiques tels que tyrosyle, phénylalanyle et tryptophanyle ou certains résidus hydrophobes (leucine, méthionine).

La zone de fixation spécifique de la chymotrypsine peut être assimilée à une "poche" à la surface de la molécule très proche du résidu séryle actif 195 qui est acylé lors de la catalyse.

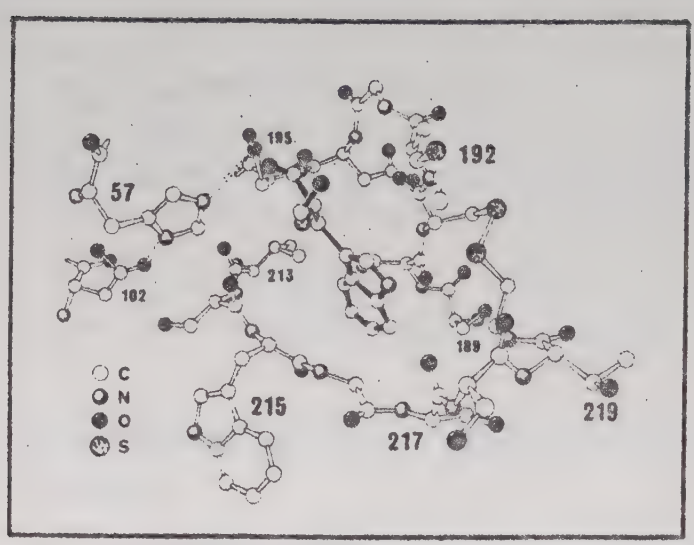


Fig. 6 - Site actif de la chymotrypsine avec le pseudo-substrat formyl-L-tryptophane dans la position déduite d'une carte de différence de densité électronique (STEITZ et Coll. 1969).

Il a pu être montré, à l'aide de pseudo-substrats (STEITZ et Coll. 1969), que la chaîne latérale hydrophobe de ceux-ci forme de nombreuses liaisons de type Van der WAALS avec les chaînes hydrophobes et les groupes peptidiques qui composent le site de fixation (fig. 6).

La spécificité stricte de la trypsine pour des groupes chargés positivement provient de la présence d'un résidu aspartyle en position 177 qui est chargé négativement au pH optimum d'activité (STROUD et Coll. 1974).

1.2. *Méthodologie de l'étude de l'influence de la modification chimique d'un résidu d'acide aminé sur l'activité et la structure d'une protéine*

L'utilisation de techniques de marquage appropriées a aidé à la compréhension de la structure et du mode d'action des sites

actifs des enzymes.

Parmi les résidus composant une enzyme, on définit comme intervenant dans l'activité enzymatique ceux dont la modification entraîne une inactivation de l'enzyme. Ces résidus peuvent intervenir :

- dans la fixation du substrat
- directement dans la catalyse
- directement ou indirectement dans le maintien d'une conformation indispensable à l'activité.

La modification chimique des groupes fonctionnels d'une enzyme permet d'identifier la nature du résidu substitué et d'en évaluer le rôle.

Cette démarche est limitée, dans son interprétation, par plusieurs facteurs :

1°/ - Le manque de spécificité des réactifs d'acides aminés

La modification chimique d'une enzyme, entraînant un changement d'activité, ne peut établir la responsabilité du seul groupe modifié.

2°/ - La modification des propriétés d'un résidu d'acide aminé dans une protéine ne peut être comparée à celle obtenue pour le même acide aminé libre, ou lié dans un peptide.

Sa réactivité pourra être due, soit à sa présence au sein d'un groupe de résidus fonctionnels, soit à son exposition, ou à son "masquage" dans la protéine.

3°/ - La complexité du phénomène de décroissance de l'activité

Celle-ci peut ne pas être due directement à la perturbation des propriétés d'un groupe important, mais indirectement à celles d'un groupe non essentiel modifiant le micro-environnement du groupe fonctionnel.

4°/ - Les difficultés d'obtention de conditions de réaction, compatibles avec la stabilité de la protéine

Pour ces raisons, il est nécessaire de préciser l'effet de perte d'activité et de blocage d'un résidu par d'autres méthodes :

. Etudes structurales : - étude comparée de l'enzyme native et modifiée

- détermination de l'emplacement de l'acide aminé modifié dans la séquence

- intégration des résultats obtenus aux données structurales fournies par l'étude cristallographique de la protéine.

. Etudes cinétiques : - analyse cinétique de la perte d'activité, évaluation des constantes de l'enzyme modifiée sur différents substrats synthétiques

- analyse de la modification de la spécificité sur des substrats naturels.

L'interprétation des résultats obtenus se fera donc en tenant compte, sans cesse, de ces limitations.

1.3. Schéma général

L'obtention d'enzymes pures et la synthèse de réactifs nouveaux, plus spécifiques ou dont le mode d'action est mieux connu nous ont incité à entreprendre de nouvelles études ou à revoir d'un oeil nouveau des résultats antérieurs.

Dans notre cas, la séparation de la trypsine cristalline par SCHROEDER et SHAW en 1968, en deux constituants principaux, trypsine α et trypsine β, représentant à elles deux entre 50 et 60 % des préparations commerciales, nous a incité à remettre en question des travaux préalablement publiés.

C'est tout particulièrement le cas de la modification chimique des résidus tyrosyles qui, de 1965 à 1972, fut faite sur la trypsine cristalline et donna des résultats variables selon les auteurs (HACHIMORO et Coll. 1965, RIORDAN et Coll. 1965, SHLYALPNIKOV et Coll. 1968, HOLEYSOVSKY 1971, KENNER et Coll. 1968, KELLERSON 1970).

L'utilisation du tétranitrométhane, préconisé par RIORDAN et Coll. (1966), comme réactif spécifique des résidus tyrosyles, entraîne des réactions parallèles étudiées plus particulièrement par VINCENT et Coll. (1970). Les résultats obtenus doivent être alors examinés, en tenant compte des remarques de ces derniers auteurs.

Enfin, KOSHLAND et son équipe introduisent en 1964, le bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyle comme réactif spécifique du tryptophane. Ce réactif est testé par cet auteur sur la chymotrypsine α, mais sans que soit cherchée l'influence de la modification sur l'activité, ni précisée la position du résidu tryptophanyle modifié.

Nous nous sommes proposés au cours de ce travail de rechercher :

1) l'influence des résidus tyrosyles sur l'activité et la structure de la chymotrypsine α et la trypsine β. Pour cette étude, nous modifions chimiquement les caractéristiques des résidus tyrosyles et, après avoir déterminé l'emplacement des résidus modifiés dans la séquence de la protéine, nous essayons de caractériser les variations apportées aux divers aspects de la fonction enzymatique : activité catalytique, fixation de substrats ou d'inhibiteurs, spécificité. Les résultats obtenus sont ensuite comparés en relation avec les structures tertiaires des protéines.

2) De même, la substitution de résidu tryptophanyle dans la trypsine β amène des modifications de l'activité protéolytique qui sont comparées à celles d'autres enzymes : chymotrypsine et élastase.

Du fait des différences notables existant entre ces deux types de modification chimique effectuées, d'autre part, sur des enzymes différentes, pour la clarté de l'exposé, nous avons séparé ce mémoire en trois parties correspondant à :

- Rôle des tyrosines dans les chymotrypsines α et δ
- Rôle des tyrosines dans la trypsine β
- Rôle des tryptophanes dans la trypsine β

Les liens naturels de structure existant entre ces enzymes protéolytiques permettront une compréhension plus générale des rôles de ces résidus aminoacides dans ces protéines.

Afin de ne pas alourdir la présentation des résultats, la bibliographie a volontairement été restreinte aux seules publications relatives à la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase.

2 - MÉTHODES

2.METHODES

2.1. Nitration des protéines

- Le chymotrypsinogène et la chymotrypsine sont nitrés essentiellement selon la méthode de SHYALPNIKOV et Coll. (1968), 100 mg de protéine sont dissous dans 20 ml de Tris 0,1 M HCl, pH 8,0, $CaCl_2$ 0,02 M. Un excès de tétranitrométhane (rapport molaire tétranitrométhane/tyrosine = 25 en solution à 25 % dans l'éthanol 96 %) est alors ajouté.

Le milieu réactionnel est agité à température ambiante et le degré de nitration est suivi par mesure d'absorption à 428 nm (SOKOLOVSKY et Coll. 1966). Après 165 min. de réaction, les produits de réaction sont séparés sur une colonne de Sephadex G-50 (2,6 x 30 cm), équilibrée et éluée avec un tampon Tris 10^{-3} M HCl, pH 8,0 à 4°C. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et lyophilisées.

L'homogénéité des chymotrypsines et chymotrypsinogène modifiés a été testée à la fois par chromatographie sur Sephadex G-100 et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH 8,6 selon MITCHELL (1967).

- La trypsine β est purifiée, à partir de la trypsine commerciale Worthington, selon SCHROEDER et SHAW (1968), par chromatographie sur gel de SE- Sephadex C-50 dans un tampon Tris 0,1 M HCl, $CaCl_2$ 0,02 M, benzamidine 10^{-3} M, pH 7,1.

La mesure de l'absorption à 428 nm est utilisée pour suivre la nitration de la trypsine β en fonction du temps.

Celle-ci est effectuée ainsi qu'il est fait pour la chymotrypsine avec les modifications suivantes :

- concentration de trypsine β : 2 mg par ml ;
- rapport tétranitrométhane/enzyme : 40, soit tétranitrométhane/tyrosine : 4 ;
- séparation sur colonne de Sephadex G-75 (2,6 x 30 cm) équilibrée et éluée avec HCL 10^{-3} M, à 4°C.

Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et dialysées contre HCl 10^{-3} M pendant 12 heures à 4°C avec de nombreux changements, puis lyophilisées.

2.2. Substitution de la trypsine β et de l'élastase par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle

La trypsine β est obtenue à partir de trypsine commerciale par séparation sur SE-Sephadex G-50 dans Tris 0,1 M $CaCl_2$ 0,02 M benzamidine 10^{-3} M (SCHROEDER et SHAW 1968).

Le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle (excès molaire réactif/enzyme = 100, dissous dans le minimum d'acétone sec) est ajouté, avec agitation vigoureuse, à une solution de trypsine 0,5 mM dans NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 0,02 M, pH 4,2. Le pH est maintenu à 4,2 $\pm$ 0,1 par addition de soude 0,05 M.

Après réaction, la solution est centrifugée afin d'éliminer le produit d'hydrolyse insoluble du réactif et le surnageant est appliqué sur une colonne de Sephadex G-25. Le premier pic jaune élué est lyophilisé.

En cas de substitution en présence de benzamidine, la protéine substituée est d'abord dialysée contre HCl 10^{-3} M puis précipitée par de l'acide trichloracétique 10 %. Le précipité est lavé plusieurs fois avec la même solution puis à l'acétone.

Dans le cas de l'élastase, préparation commerciale, la substitution se fait dans les mêmes conditions, seule le pH est maintenu à 5,4, l'enzyme étant rapidement inactivée aux pH égaux ou inférieurs à 4,0.

2.3. Détermination des constantes spectrophotométriques

Les concentrations en protéine sont déterminées par absorption ultraviolette à 280 nm en utilisant un coefficient molaire d'extinction de 5.10^{-4} M^{-1} cm^{-1} pour le chymotrypsinogène et la chymotrypsine (DIXON et NEURATH 1957).

Pour les protéines nitrées l'absorption molaire à 280 nm ($\varepsilon_M = 5,7.10^{-4}$ M^{-1} cm^{-1}) a été déterminée sur la base de la concentration en protéine obtenue par dosage des acides aminés.

Pour la trypsine β le coefficient d'absorption utilisé pour

le calcul de la concentration à 280 nm est $E^{1\ cm}_{1\ \%}$ = 16,1 (D'ALBIS et BECHET 1967).

Pour la forme nitrée, le coefficient d'absorption à 280 nm a été déterminé sur la base de la concentration en protéine obtenue par dosage des acides aminés : $E^{1\ cm}_{1\ \%}$ = 22,7.

Le nombre de 3-nitrotyrosines par molécule sera obtenu en calculant le rapport de la concentration molaire de résidus tyrosyles nitrés (ε_M = 4100 M^{-1} cm^{-1} à 428 nm, pH 9,0) et de la concentration molaire en protéine déterminée à 280 nm.

L'estimation du nombre de groupes 2-hydroxy-5-nitrobenzyles incorporés est effectuée à pH 12,0 selon BARMAN et KOSHLAND (1967). Le nombre de groupes 2-hydroxy-5-nitrobenzyles incorporés est obtenu en faisant le rapport de la concentration déterminée à 410 nm des groupes substitués (ε_M = 18.000 M^{-1} cm^{-1}) et de la concentration en protéine mesurée à 280 nm (ε_M = 38.300 M^{-1} cm^{-1}).

2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les résultats obtenus par des trypsines nitrées et natives des sites actifs sont confirmés par électrophorèse :

- en gel basique (pH 8,6), (URIEL 1966), deux bandes de protéines sont colorées par le bleu de Coomassie représentant les trypsines α et β nitrées. Leur migration est différente de la forme β native, du fait de la modification du point isoélectrique de la protéine par la nitration des résidus tyrosyles.

- en gel + S.D.S. (Sodium Dodécyl Sulfate) et gradient de densité (5 à 15 %) (AMES 1974). Il apparaît trois bandes correspondant à :
  - une bande intense correspondant à un PM = 24.000
  - deux bandes claires correspondant à des PM = 11.000 et 13.000.

Les deux bandes claires proviennent de la dissociation des deux chaînes de la trypsine α nitrée.

2.5. Détermination de la composition en acides aminés

Les analyses d'acides aminés sont effectuées selon la méthode de SPACKMAN et Coll. (1958) d'après le procédé en mono-colonne de DEVENYI (1969). La protéine, ou le peptide, est hydrolysée, en tube scellé sous vide, durant 24 heures par HCl 6N à 110°C. La 3-nitrotyrosine est éluée après la phénylalanine (SOKOLOVSKY et Coll. 1966).

La teneur en tryptophane est déterminée selon la méthode de LIU et CHANG (1971). L'acide chlorhydrique 6N est remplacé par l'acide méthane sulfonique 4N. Le pic de tryptophane précède les résidus basiques.

2.6. Analyse de l'acide aminé NH_2 terminal

La détermination des groupes N-terminaux du chymotrypsinogène et de la chymotrypsine δ est effectuée selon la méthode de FRAENKEL-CONRAT et Coll. (1955) sur les produits dénaturés par la chaleur. Après 40 heures d'hydrolyse, les rapports relatifs à l'isoleucine pris comme référence des dérivés dinitrophénylés des acides aminés sont déterminés au spectrophotomètre après séparation par chromatographie sur couche mince selon LABOUESSE et GERVAIS (1967) en utilisant le système de solvants de BISERTE et OSTEUX (1951).

	*DNP-acides aminés		
	Ile**	Ala	Thr
Chymotrypsine δ nitrée	1	0,15	0,06
Chymotrypsine δ	1	0,10	0,02

* DNP = dinitrophényl
** Ile pris comme référence

Tableau 1 - Acides aminés NH_2 terminaux du chymotrypsinogène et de son produit d'activation : la chymotrypsine δ

La forme monomère de la trypsine nitrée est analysée par la méthode de dansylation selon ZANETTA et Coll. (1970). Une tache principale de dansyl-isoleucine est révélée en fluorescence, ainsi qu'une tache secondaire de dansyl-sérine correspondant respectivement à l'acide aminé NH_2 terminal de la trypsine β et de la première chaîne de la trypsine α et au résidu NH_2 terminal de la deuxième chaîne de la trypsine α.

Pour la trypsine substituée par le réactif de KOSHLAND, la méthode au dinitrofluorobenzène selon NAROTA (1970) a été utilisée. Après hydrolyse, les acides aminés dinitrophénylés sont séparés sur couche mince (BRENNER et Coll. 1966).

2.7. *Identification de la position des résidus tyrosyles nitrés dans la séquence de la chymotrypsine α, du chymotrypsinogène et de la trypsine β*

La position des tyrosines pouvant être nitrées est évaluée selon la méthode décrite par SHLYAPNIKOV et Coll. (1968).

a) Les ponts disulfures de la protéine nitrée sont rompus par sulfitolyse oxydative (PECHERE et Coll. 1958). Les ions cuivriques du milieu réactionnel sont complexés par l'éthylène diamine tétracétate. Les chaînes peptidiques S-sulfonées sont séparées des sels par passage sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée et éluée avec une solution de NH_4OH 0,1 M.

b) La protéine nitrée et S-sulfonée est ensuite hydrolysée par la chymotrypsine α (rapport molaire enzyme/substrat de 1/50) durant 14 heures à 37° dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M, pH 8,5.

c) Les cartes peptidiques sont réalisées par électrophorèse descendante (MIKEŠ 1957) à pH 5,6 (acide acétique-pyridine-eau 1/4/399 V/V/V/) 27 V/cm et perpendiculairement par chromatographie descendante (butanol-acide acétique-eau-pyridine, 15/3/10/12 volume à volume).

Les cartes peptidiques sont révélées à la ninhydrine 0,2 % dans l'acétone. Les peptides contenant de la tyrosine sont ensuite détectés par trempage de la feuille de papier dans une solution à

0,1 % d'α-nitroso β-naphtol suivi d'acide nitrique à 10 % dans l'acétone. Les peptides contenant des tyrosines nitrées se colorent en jaune au contact de vapeurs d'ammoniaque et absorbent en ultraviolet.

Pour le chymotrypsinogène et la chymotrypsine α nitrés, les peptides nitrés n'ont pas été isolés, mais leur composition en acides aminés a été obtenue en comparant les cartes peptidiques que nous avons réalisées avec celles publiées par SHLYAPNIKOV et Coll. (1968) et où l'analyse de la composition en acides aminés des peptides avait été effectuée.

La trypsine β nitrée, S-sulfonée est hydrolysée selon la technique décrite par HOLEYSOVSKY et Coll. (1969) : rapport enzyme/substrat égal à 1/100, successivement par : trypsine (30 min.), chymotrypsine (60 min.), trypsine (20 heures), pepsine (3 heures), puis de nouveau pepsine (65 heures).

L'hydrolysat est lyophilisé (il ne se forme pas de précipité) et est séparé selon les quatre méthodes suivantes :

- Electrophorèse à pH 3,7 (pyridine-acide acétique-eau, 1-10-289 volume à volume) 54 V/cm, 90 min.
- Electrophorèse à pH 1,9 (acide formique-acide acétique-eau, 25-150-825 volume à volume) 54 V/cm, 90 minutes.
- Chromatographie a) Butanol-acide acétique-eau 400-100-500 volume à volume
  b) Butanol-acide acétique-pyridine-eau 300-60-200-240 volume à volume

Les peptides nitrés sont élués et leur composition en acides aminés est déterminée.

2.8. Identification des résidus tryptophanyles modifiés

Le mode opératoire est, pour l'essentiel, semblable à ce qui est décrit au § *2.7.* Cependant l'hydrolyse de la protéine S-sulfonée a été réalisée par la trypsine β. Les fractions à haut poids moléculaire ont été hydrolysées de nouveau, par la subtilisine durant une incubation de 18 heures.

Les méthodes utilisées pour la purification des peptides obtenus sont résumées en un tableau au § "Résultats".

2.9. Action de la carboxypeptidase A sur la chymotrypsine α nitrée

La chymotrypsine α nitrée est traitée par la carboxypeptidase A (rapport molaire chymotrypsine α-carboxypeptidase A : 50/1 à 25°C et pH 8,4 (tampon N-éthylmorpholine 0,2 M acide acétique (GHELIS 1971). La libération de la tyrosine nitrée est suivie par titrage spectrophotométrique du surnageant à 428 nm après précipitation par ébullition 5 min. à 100°C d'aliquotes du milieu d'incubation en fonction du temps. Le pH du surnageant est amené, après centrifugation, à pH 9,5 par dilution avec un tampon de bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pour mesure spectrophotométrique à 428 nm des résidus tyrosyles nitrés.

2.10. Activation du chymotrypsinogène et du chymotrypsinogène nitré

L'activation a été effectuée de telle manière que la forme δ de la chymotrypsine soit obtenue préférentiellement (OPPENHEIMER et Coll. 1966).

Le zymogène est dissous dans une solution de borate de sodium 0,02 M $CaCl_2$ 0,1 M, pH 8,0 à une concentration d'environ 5 mg/ml.

La trypsine β est ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 0,12 mg par ml et le mélange est dialysé contre du tampon borate pH 8,0, $CaCl_2$ 0,01 M pendant 15 heures à 4°C. La trypsine est ensuite adsorbée sur une colonne d'affinité d'agarose-ovomucoïde (CUATRECASAS et Coll. 1968) et les fractions de l'éluat, contenant la chymotrypsine non adsorbée sont réunies et lyophilisées.

2.11. Mesure des activités enzymatiques

2.11.1. Titrage du site actif

a) Chymotrypsines

La concentration d'enzyme active est déterminée par titrage des sites actifs par le N-trans-cinnamoyle imidazole

(SCHOENBAUM et Coll. 1961). Les échantillons de chymotrypsine α et de chymotrypsine δ contiennent respectivement 82 et 90 % du nombre théorique des sites actifs.

b) Trypsines

La détermination du nombre total de sites actifs par rapport au nombre théorique calculé à partir de la concentration en protéine, a été effectuée selon la méthode de CHASE et SHAW (1967) utilisant le p-nitrophényl-p'-guanidinobenzoate HCl pour titrant.

Il est également possible de distinguer les formes α et β en effectuant le dosage à pH 3,83 (tampon formiate $CaCl_2$ 0,02 M) et à 320 nm (FOUCAULT 1972).

2.11.2. Dosage de l'activité vis-à-vis de substrats spécifiques

a) Chymotrypsines

L'activité estérasique envers le N-acétyl-L-tyrosyl éthylester est déterminée à pH 8,0 et 30°C à des concentrations de substrat allant de 0,25 à 4,0 mM dans un tampon Tris 0,1 mM HCl, KCl 0,1 N, par titration des protons libérés par NaOH 0,05 N en utilisant un pH Stat. Les constantes V_{max} et K_m sont évaluées par la méthode graphique de EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN (1974).

L'activité estérasique envers le N-acétyl-L-tryptophane-méthylester est mesurée à 27°C au spectrophotomère (ZERNER et BENDER 1970, VALENZUELA et BENDER 1964). Les constantes cinétiques sont calculées d'après la représentation de LINEWEAVER-BURK, la concentration en substrat variant de 0,3 à 1 mM.

L'activité envers le N-benzoyl-L-tyrosine-éthylester est mesurée au spectrophotomètre selon HUMMEL (1959).

b) Trypsines

L'activité amidasique de la trypsine est mesurée au spectrophotomètre par la méthode d'ERLANGER-KOKOWSKY et COHEN (1961) utilisant le N-α-benzoyl-D-L-arginine-p-nitroanilide pour substrat.

L'activité estérasique envers le N-benzoyl-L-arginine-éthylester (Bz-Arg-OEt) est déterminée à pH 8,0 et 25°C au pH mètre

autotitrateur. L'activité envers le p-tosyl-L-arginine-méthyl-ester (Tos-Arg-OMet) (HUMMEL 1959) est mesurée au spectrophotomètre.

La caséine α(concentration 0,3 et 1 % dans NaCl 0,1 M $CaCl_2$ 0,02 M pH 7,6) sert de substrat pour l'hydrolyse protéolytique mesurée au pH mètre autotitrateur à 37°C.

c) Elastase

L'N-α-benzoyl-L-alanine-méthylester a été utilisé comme substrat de l'élastase (SHOTTON 1970). Les cinétiques d'hydrolyse sont enregistrées au pH mètre autotitrateur.

2.12. Stabilité comparée de la chymotrypsine α et de la chymotrypsine α nitrée

La décroissance d'activité enzymatique en fonction du temps à un pH donné est suivie par la cinétique d'hydrolyse de l'acétyl-L-tyrosine-éthylester (Ac-Tyr-OEt) au spectrophotomètre en utilisant la différence d'absorption molaire du substrat et de son produit d'hydrolyse ($\Delta\varepsilon_M$ = 280 M^{-1} cm^{-1} à 237 nm) (KUMAR 1969).

L'enzyme est dissoute, au temps zéro, dans le tampon de pH approprié, prééquilibré à 30°C, à une concentration finale de 1 mg/ml.

Des aliquotes du milieu d'incubation, 20 à 100 µl sont ajoutées à 3 ml d'Ac-Tyr-OEt 1,5 mM dans du tampon phosphate de sodium 0,14 pH 7,0.

V_{max} et K_m sont calculées à partir de la courbe obtenue en utilisant l'équation intégrée de MICHAELIS-MENTEN.

La méthode de KUMAR (1970), selon le processus expérimental de ROSEN (1957) permet d'étudier la formation des produits d'autolyse par mesure colorimétrique à la ninhydrine des extrémités NH_2 libres formées durant l'incubation.

2.13. Interaction avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine

Les constantes de vitesse d'association et de dissociation des enzymes nitrées avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine sont déterminées à 30°C, selon le mode opératoire de VINCENT et LAZDUNSKI (1973).

Les cinétiques d'association sont évaluées en suivant la décroissance de l'activité chymotrypsique, en présence de l'inhibiteur, pour le N-acétyl-L-tyrosine-éthylester 10 mM dans NaCl 0,2 M et 3 % d'éthanol à 96 %.

Les complexes de l'inhibiteur avec les différentes formes d'enzymes sont préparés par incubation de 30 mn et isolés de l'excès d'inhibiteur par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-100 en tampon de bicarbonate d'ammonium 0,01 M (IMHOFF et KEIL-DLOUHA 1971). Le complexe est ensuite ajouté à une solution de N-acétyl-L-tyrosine-éthylester 30 mM dans un tampon Tris 1 mM HCl pH 8,0 NaCl 0,2 M et les cinétiques de dissociation sont suivies par mesure de l'accroissement d'activité en fonction du temps.

2.14. Interaction de la trypsine substituée avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine

Le complexe formé entre l'inhibiteur et la trypsine substituée après incubation de ceux-ci (rapport molaire : 4/1) pendant 30 min. à température ambiante dans le tampon de chromatographie est isolé par passage du mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex G-100 (IMHOFF et KEIL-DLOUHA 1971). L'activité inhibitrice des fractions est mesurée au spectrophotomètre, avec le N-α-benzoyl-D-L-arginine-p-nitroanilide comme substrat, après précipitation de la protéine ainsi qu'il est décrit par DLOUHA et Coll. (1968).

2.15. Détermination de la spécificité

a) Chymotrypsines

Les comparaisons de spécificité entre formes nitrées et

non nitrées des chymotrypsines α et δ sont faites par étude des coupures obtenues sur une préparation commerciale de chaîne B oxydée de l'insuline : ce substrat est obtenu par scission oxydative des ponts disulfures de la protéine. Ce procédé provoque une oxydation partielle des résidus tyrosyles. La préparation commerciale est donc un mélange de chaînes B de l'insuline dont les résidus tyrosyles peuvent être intacts ou oxydés.

La chymotrypsine δ est obtenue par activation du chymotrypsinogène avec une concentration relativement élevée de trypsine β (rapport molaire enzyme / substrat : 1/50). Malgré le passage du mélange réactionnel sur une colonne d'agarose-ovomucoïde afin d'éliminer la trypsine β à la fin de l'activation, l'activité trypsique de la forme activée (δ) du chymotrypsinogène, mesurée sur un substrat spécifique, le p-tosyl-L-arginine-méthyl-ester (HUMMEL 1959), est encore égale à 0,43 % de celle de la trypsine. En comparaison, l'activité trypsique de la chymotrypsine α n'est que de 0,03 %.

Afin d'inhiber cette activité résiduelle, la chymotrypsine δ est traitée par un inhibiteur spécifique de la trypsine, le N(p-nitro-benzyloxycarboxyl)arginine chlorométhane (SHAW et GLOVER 1970), elle est alors ramenée à 0,03 % alors que l'activité chymotrypsique, mesurée sur N-benzoyl-L-tyrosine-éthylester est de 96 %.

L'enzyme est ajoutée dans un rapport enzyme/substrat de 1/1000 à une solution de chaîne B de l'insuline (6 mg/ml) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M. L'hydrolyse est poursuivie durant 8 heures à 37°C. Le mélange réactionnel est ensuite lyophilisé.

Le mélange peptidique est séparé sur papier Whatmann 1 MM :

- 1ère direction : Electrophorèse pH 3,7 (pyridine-acide acétique-eau 1/10/289 volume à volume (80 V/cm) 60 min.
- 2ème direction : Chromatographie (butanol-acide acétique-pyridine eau 15/3/10/12 volume à volume).

La carte peptidique obtenue est révélée par une solution de ninhydrine 0,02 % dans l'acétone. Les taches obtenues sont découpées et éluées à l'aide d'une solution d'ammoniaque 0,01 M. La composition des peptides est obtenue, après hydrolyse à l'aide d'un analyseur d'acides aminés (voir § 2.5.).

b) Trypsines

Les comparaisons de spécificité entre forme nitrée et non nitrée de la trypsine β sont faites par étude des coupures obtenues sur la chaîne B oxydée de l'insuline.

- Rapport enzyme/substrat : 1/200 dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,01 M (concentration en substrat 3 mg/ml)

- Durée de l'hydrolyse : 45 min. à 37°C.

Après lyophilisation, le mélange peptidique est séparé sur papier Whatmann 1 MM dans les conditions décrites ci-dessus.

La composition en acides aminés des peptides élués est déterminée.

3 - Influence de la modification des résidus tyrosyles sur l'activite et la conformation de la chymotrypsine

3. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DES RESIDUS TYROSYLES SUR L'ACTIVITE ET LA CONFORMATION DE LA CHYMOTRYPSINE

3.1. Introduction

La chymotrypsine sous forme active provient de l'activation, dans le duodénum des vertébrés, du chymotrypsinogène, secrété par le pancréas.

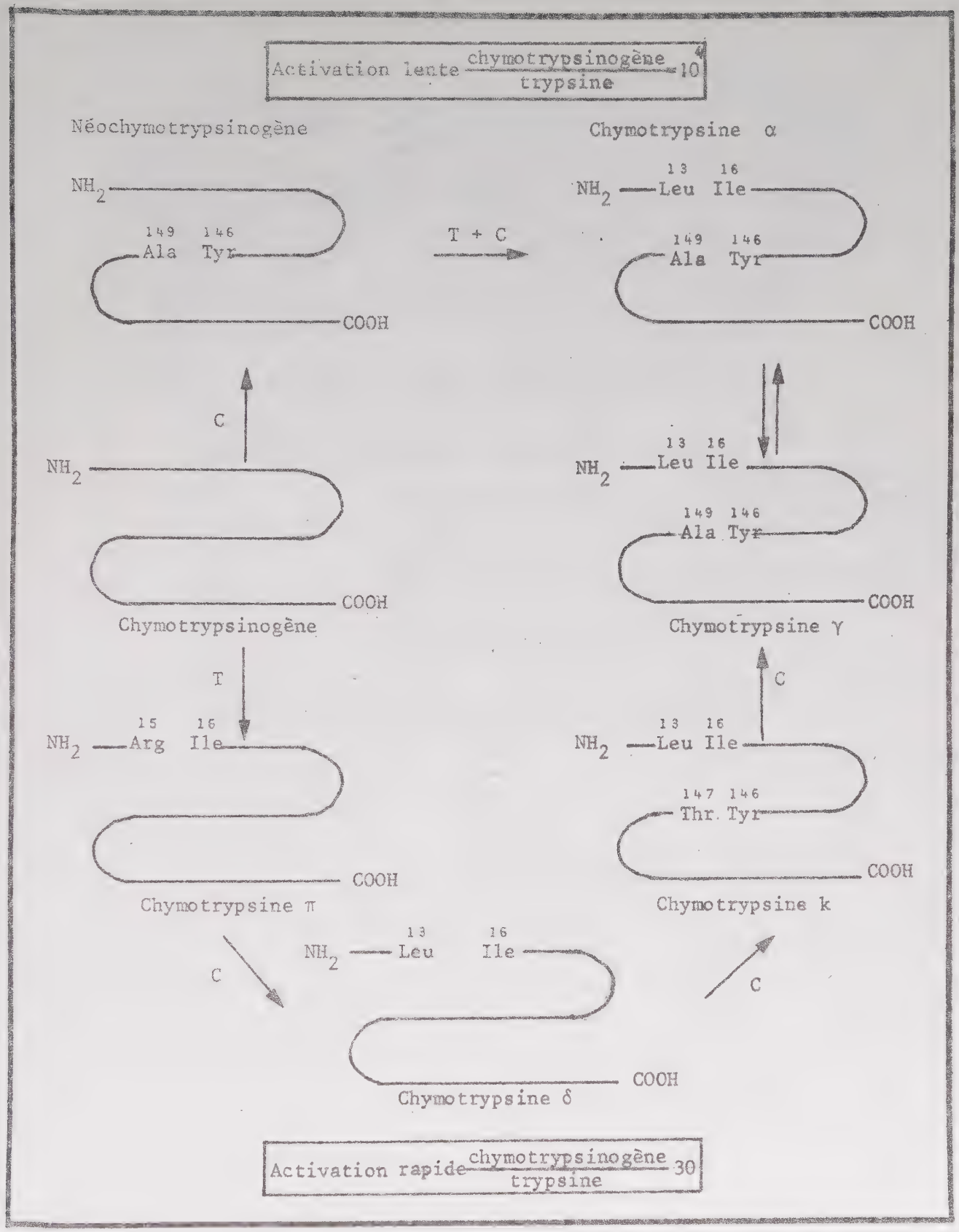
L'activation est due à la seule coupure de la liaison peptidique Arg 15-Ile 16 par la trypsine. La forme active obtenue est appelée chymotrypsine π. Cependant, selon les conditions expérimentales, plusieurs étapes peuvent être distinguées, menant aux diverses chymotrypsines connues (WRIGHT et Coll. 1968 , MILLER et Coll. 1971) (fig. 7, page suivante).

Tous les produits formés après la coupure de la liaison Arg 15-Ile 16 proviennent d'une autodégration de la chymotrypsine π.

La chymotrypsine δ a perdu le dipeptide Ser 14-Arg 15. C'est la principale forme obtenue à partir du chymotrypsinogène par activation rapide avec des quantités relativement importantes de trypsine.

Les chymotrypsines α et γ qui proviennent par perte de deux dipeptides de la chymotrypsine π (Ser 14-Arg 15 et Thr 147-Asn 148) sont obtenues par activation lente avec des concentrations faibles de trypsine, la forme γ se formant, par rapport à la chymotrypsine α à un pH plus élevé, 5,6 et en un temps long : 4 ou 5 jours.

L'étude comparative aux rayons X des cristaux des formes inhibées par le phénylméthanesulfonyle des chymotrypsines π , δ, γ a permis de montrer qu'elles ne différaient entre elles que par des détails mineurs (KRAUT et Coll. 1967). La structure tertiaire de la chymotrypsine α se distingue de celles des chymotrypsines π et δ uniquement dans la région de la coupure de la liaison peptidique Tyr 146-Thr 147 avec perte du dipeptide Thr 147-Asn 148 formant ainsi une extrémité COOH terminale libre supplémentaire, le résidu tyrosyle 146 (fig. 1 et fig. 8 page suivante).



C : hydrolyse chymotrypsique

T : hydrolyse trypsique

FIG. 7 - Activation du chymotrypsinogène
d'après MILLER et Coll. (1971)

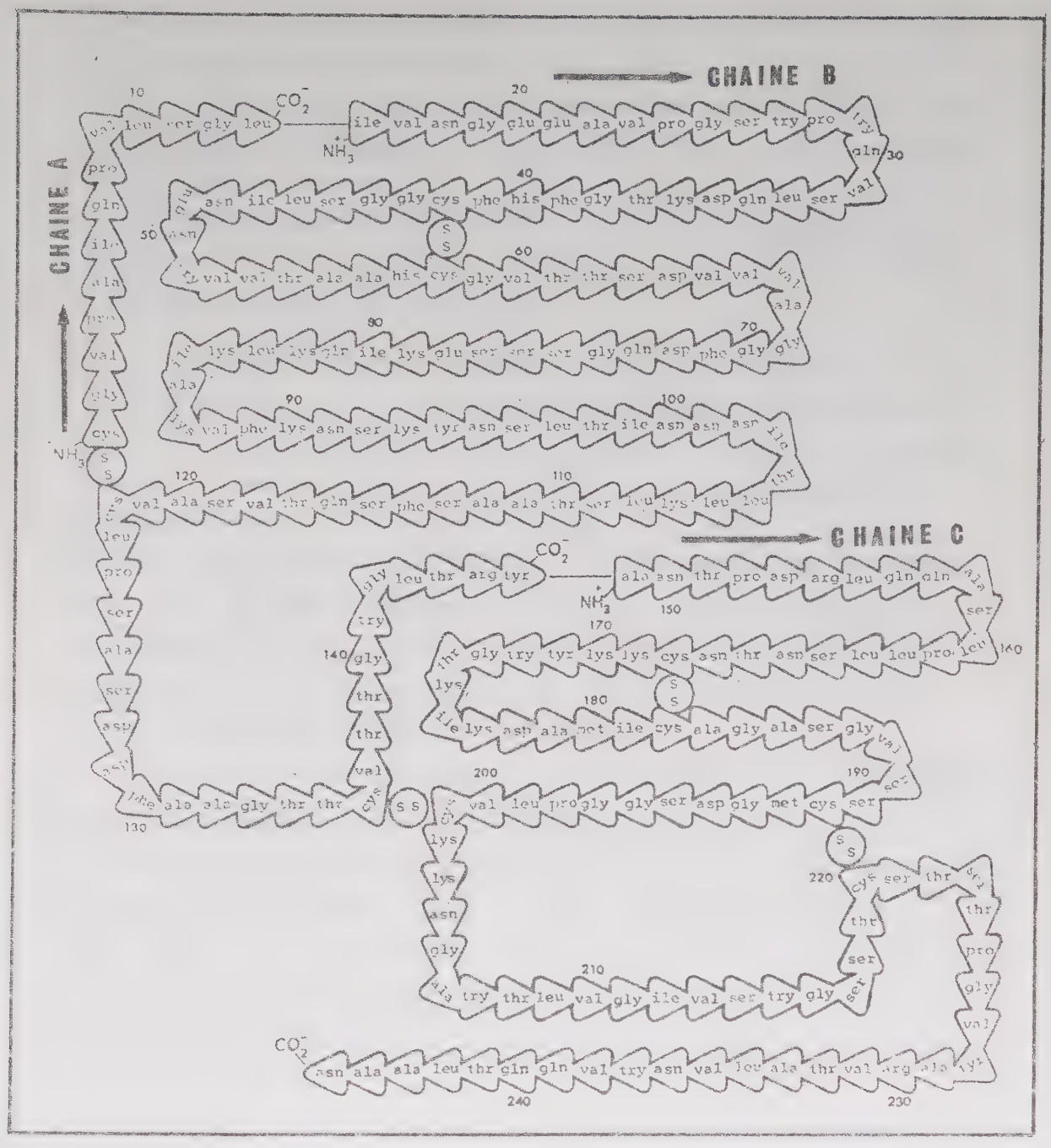


Fig. 8 - Séquence des acides aminés de la chymotrypsine
(d'après MATTHEWS et Coll. 1967)

Cependant, en solution, les propriétés des chymotrypsines α et δ, activité, stabilité ou possibilité de dimérisation, diffèrent.

Les résidus tyrosyles du chymotrypsinogène et de la chymotrypsine sont en position 94, 146, 171 et 228 dans la séquence des 245 aminoacides du zymogène (fig. 4 p 10). Ils ont été caractérisés par leurs constantes d'ionisation,les valeurs de pK de leurs groupes phénoliques (INADA et Coll. 1964). Deux résidus sont rapidement ionisables avec des pK de 10,7 et 12,4 et de 10,2 et 11,3 respectivement pour le zymogène et l'enzyme. Le passage d'un pK de 12,4 à 11,3 est attribué à un déplacement du groupe phénolique d'une tyrosine lors de l'activation.

La réactivité des résidus tyrosyles de la chymotrypsine α a été étudiée par action du fluorure de cyanogène (HACHIMORO et Coll. 1965), du N-acétylimidazole (RIORDAN et Coll. 1965), du monochlorure d'iode (GLAZER et Coll. 1964) et du tétranitrométhane (RIORDAN et Coll. 1966, SHLYA PNIKOV et Coll. 1968). Seuls deux résidus tyrosyles étaient substitués par ces différents réactifs ; leur position dans la séquence de l'enzyme a été déterminée par SHLYALPNIKOV et Coll. (1968) : Tyr 146, Tyr 171. Dans le chymotrypsinogène un troisième résidu, Tyr 94 est nitré par le tétranitrométhane (SHLYA PNIKOV et Coll. 1968).

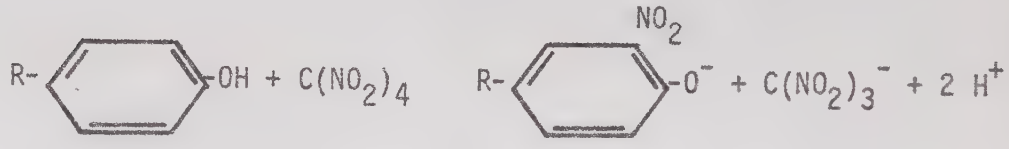
Dans le complexe formé par la chymotrypsine α et l'inhibiteur trypsique du pancréas, inhibiteur polypeptidique de PM = 6400, les mêmes résidus tyrosyles, soit 146 et 171, sont nitrés par le tétranitrométhane (HOLT et Coll. 1972). Par contre l'iodation par le monochlorure d'iode du dimère de la chymotrypsine α sous forme cristalline, n'affecte que le résidu tyrosyle 171 ; le résidu tyrosyle 146 étant lié au résidu séryle 183 de la deuxième molécule de chymotrypsine α par un pont sulfate.

Aucune de ces études ne signale de variation d'activité liée à la modification chimique utilisée. L'objectif des différentes études rapportées ici est l'attribution de pK définis aux différents résidus titrables, liés à une détermination des résidus "exposés" ou non au solvant dans la structure tertiaire.

3.2. Schéma expérimental

Notre objectif est de tenter de préciser l'influence d'une modification chimique des résidus tyrosyles 171, 146 et 94, sur les différents aspects de l'activité de la chymotrypsine α : stabilité en fonction du pH, constantes cinétiques, action d'inhibiteurs, spécificité, les résultats étant comparés à ceux obtenus sur la chymotrypsine δ de structure tertiaire semblable.

La modification chimique utilisée est la nitration par le tétranitrométhane. Ce réactif introduit par RIORDAN et Coll. en 1966, nitre préférentiellement les résidus tyrosyles (et les résidus cystéinyles) selon le schéma suivant :



Le mécanisme de la réaction est encore mal connu (SOKOLOVSKY et Coll. 1966).

Aucun acide aminé autre que tyrosine et cystéine ne réagit avec le tétranitrométhane si la réaction est réalisée en milieu Tris 0,05 M HCl, pH 8,0, pendant un temps n'excédant pas 90 min.

La 3-nitro-L-tyrosine possède, dans sa forme ionisée, une absorption maximale à λ = 428 nm avec un coefficient d'extinction molaire ε_M = 4100. Le dérivé 3-nitré est stable à l'hydrolyse acide par HCl 6N à 110°C. Il peut donc être dosé quantitativement.

Nous nous proposons d'appliquer à cette étude le schéma suivant :

1) Nitration puis purification de la protéine, chymotrypsinogène ou chymotrypsine α, dans des conditions permettant l'obtention d'une enzyme homogène dont seuls les résidus tyrosyles sont substitués.

2) Caractérisation des tyrosines nitrées :

a) nombre : par spectrophotométrie et analyse quantitative du contenu en acides aminés

position : par analyse des séquences des peptides nitrés obtenus par hydrolyse enzymatique de la protéine S-sulfonée.

3) Activation du chymotrypsinogène en chymotrypsine δ.

4) Mesure d'activité :

La détermination des constantes cinétiques des formes nitrées et natives permettra de préciser la nature des changements apportés à la nitration des résidus tyrosyles.

5) Stabilité en fonction du pH :

Les variations des constantes cinétiques en fonction du pH permettront l'étude de l'influence de ce paramètre.

6) Action d'inhibiteurs :

Le point 4) sera précisé par la détermination des constantes cinétiques, (constantes de vitesse d'association et de dissociation) de l'inhibiteur trypsique du pancréas, vis-à-vis de l'enzyme.

7) Spécificité :

Les variations possibles de spécificité seront étudiées par analyse des coupures des liaisons peptidiques de la chaîne B de l'insuline par les enzymes nitrées et comparaison avec les formes natives.

3.3. Résultats

3.3.1. Caractérisation du chymotrypsinogène nitré et de la chymotrypsine α nitrée

L'activité envers le N-benzoyl-L-tyrosine-éthylester a été utilisée pour tester la variation d'activité au cours de la nitration. Dans une expérience type, la chymotrypsine α subit une baisse d'activité de 45 % soit une activité résiduelle de

2040 µkatal par mg, après 165 min. de réaction.

Cependant, après purification par filtration sur gel, l'activité estérasique de la chymotrypsine α nitrée est essentiellement la même que celle de la protéine non modifiée. Le calcul est fait sur la base du nombre de sites actifs obtenus par titrage. Elle est normalement de 75 à 80 % d'enzyme active. Dans le cas du chymotrypsinogène, l'activité due à des traces de chymotrypsine ne dépasse pas 0,42 % et n'augmente pas de manière significative pendant le temps de réaction, indiquant ainsi l'absence d'activation du zymogène.

Le maximum de taux de nitration, contrôlé par mesure d'absorption à 428 nm, est atteint, pour les deux protéines, après 165 min. de réaction et correspond à 2,0 3-nitrotyrosines par molécule (tableau 2 voir ci-après).

Les teneurs en 3-nitrotyrosine et tyrosine déterminées par analyse des acides aminés indiquent que le chymotrypsinogène ainsi que la chymotrypsine α substitués contiennent deux résidus 3-nitrotyrosyles et deux résidus tyrosyles non modifiés par molécule.

enzymes	3-nitrotyrosine	tyrosine	tryptophane
Chymotrypsinogène	0 a)	4 a)	8 a)
Chymotrypsinogène nitré	1,9 c) 2,0 b)	1,9 c)	7,9 c)
Chymotrypsine α nitrée	2,0 c) 2,0 b)	1,8 c)	8,0 c)

a) KEIL et Coll. (1963)
b) par absorption des dérivés à 428 nm
c) par analyse des acides aminés

Tableau 2 - Teneurs en 3-nitrotyrosine, tyrosine et tryptophane (moles/moles d'enzyme)

Dans les conditions décrites au § *2.1.*, il n'y a pas de perte de tyrosine au cours de la nitration et la somme Tyr + 3-NO_2 Tyr est bien égale au nombre des résidus tyrosyles de la protéine native. De même les résidus tryptophanyles ne sont pas modifiés par la nitration (tableau 1).

Au cours d'une expérience, la réaction est poursuivie pour le chymotrypsinogène pendant 6 heures. Le chymotrypsinogène nitré ne contient cependant que deux 3-nitrotyrosines par molécule.

3.3.2. - Identification de la position des tyrosines nitrées

Les cartes peptidiques des protéines substituées sont semblables à celles publiées préalablement par SHLYALPNIKOV et Coll. (1968). La figure 9 page suivante ne représente que les cartes peptidiques obtenues à partir des hydrolysats de chymotrypsine α et de chymotrypsine α nitrée. Celles provenant des hydrolysats de chymotrypsinogène natif et nitré sont pratiquement identiques.

Deux-peptides contiennent des résidus tyrosyles nitrés, tandis que les résidus tyrosyles non modifiés se trouvent dans deux autres peptides. Dans la limite des moyens de détection utilisés, aucun des quatre peptides contenant des résidus tyrosyles ne semble être partiellement nitré. En comparant les cartes peptidiques, les tyrosines substituées sont identifiées comme étant les tyrosines 146 et 171, à la fois dans le chymotrypsinogène et la chymotrypsine, alors que les tyrosines 94 et 228 ne réagissent pas avec le tétranitrométhane.

Afin de confirmer les résultats précédents, nous avons cherché à tirer profit du fait que la chymotrypsine α était formée de trois chaînes A, B et C, présentant des extrémités COOH-terminales formées respectivement des résidus : leucine 13, tyrosine 146 et asparagine 245. Cette position COOH terminale rend ces résidus susceptibles d'élimination par traitement de la protéine par la carboxypeptidase A. Dans le cas de la chymotrypsine α nitrée, l'action de la carboxypeptidase A doit permettre la libération d'un résidu 3-nitrotyrosine par molécule de protéine, si le résidu tyrosyle 146 est nitré.

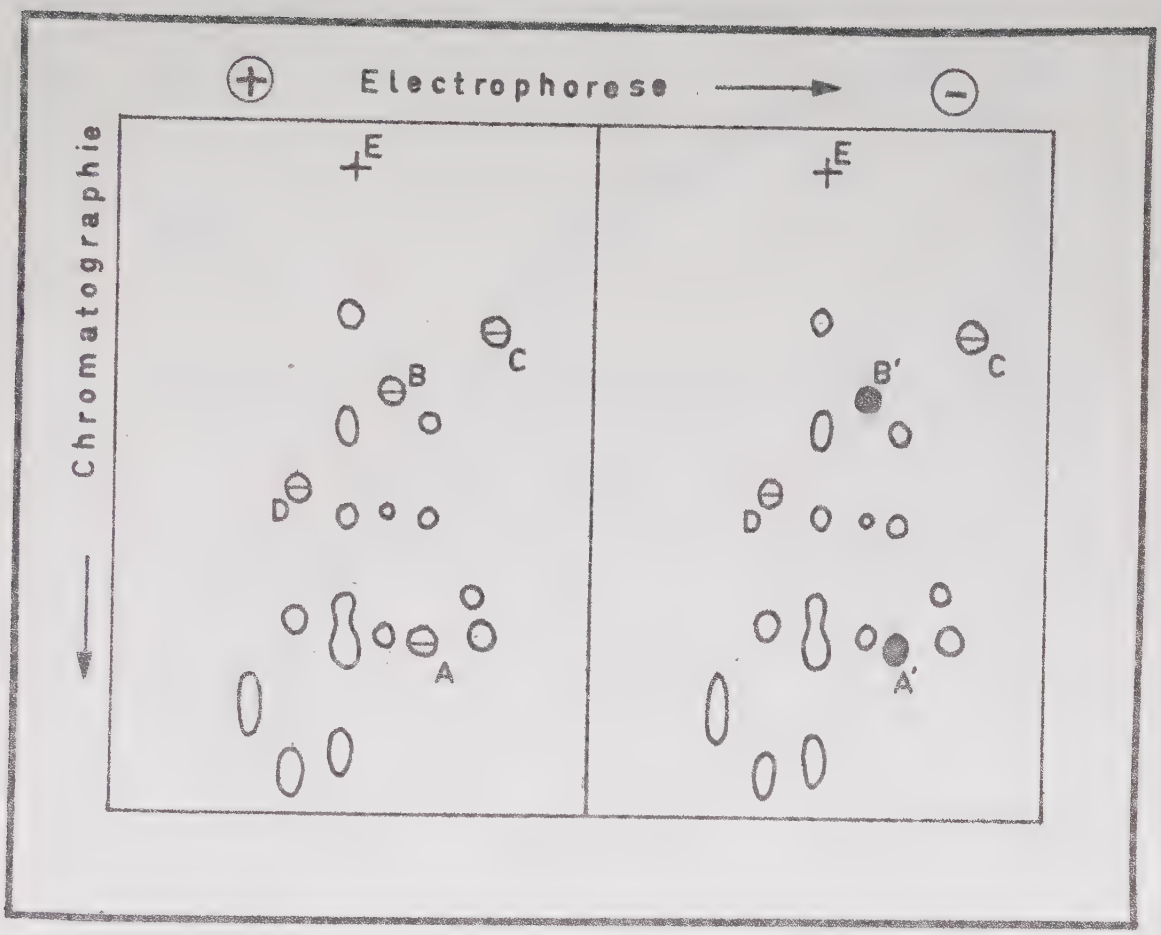


Fig. 9 - Cartes peptidiques des hydrolysats chymotrypsiques des protéines

a) S-sulfochymotrypsine b) S-sulfonitrochymotrypsine α ou δ

Peptides A : Gly-Leu-Thr-Arg-Tyr 146

B : Leu-Ser-Asn-Thr-Asn-Cys-Lys-Tyr 171

C : Lys-Asn-Ser-Lys-Tyr 94

D : Gly-Ser-Ser-Thr-Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Pro-Gly-Val-Tyr 228

A'-B': Peptides contenant de la nitrotyrosine

La figure 10 représente, en fonction du temps, le titrage spectrophotométrique à 428 nm du surnageant obtenu selon les conditions du § *2.9.*

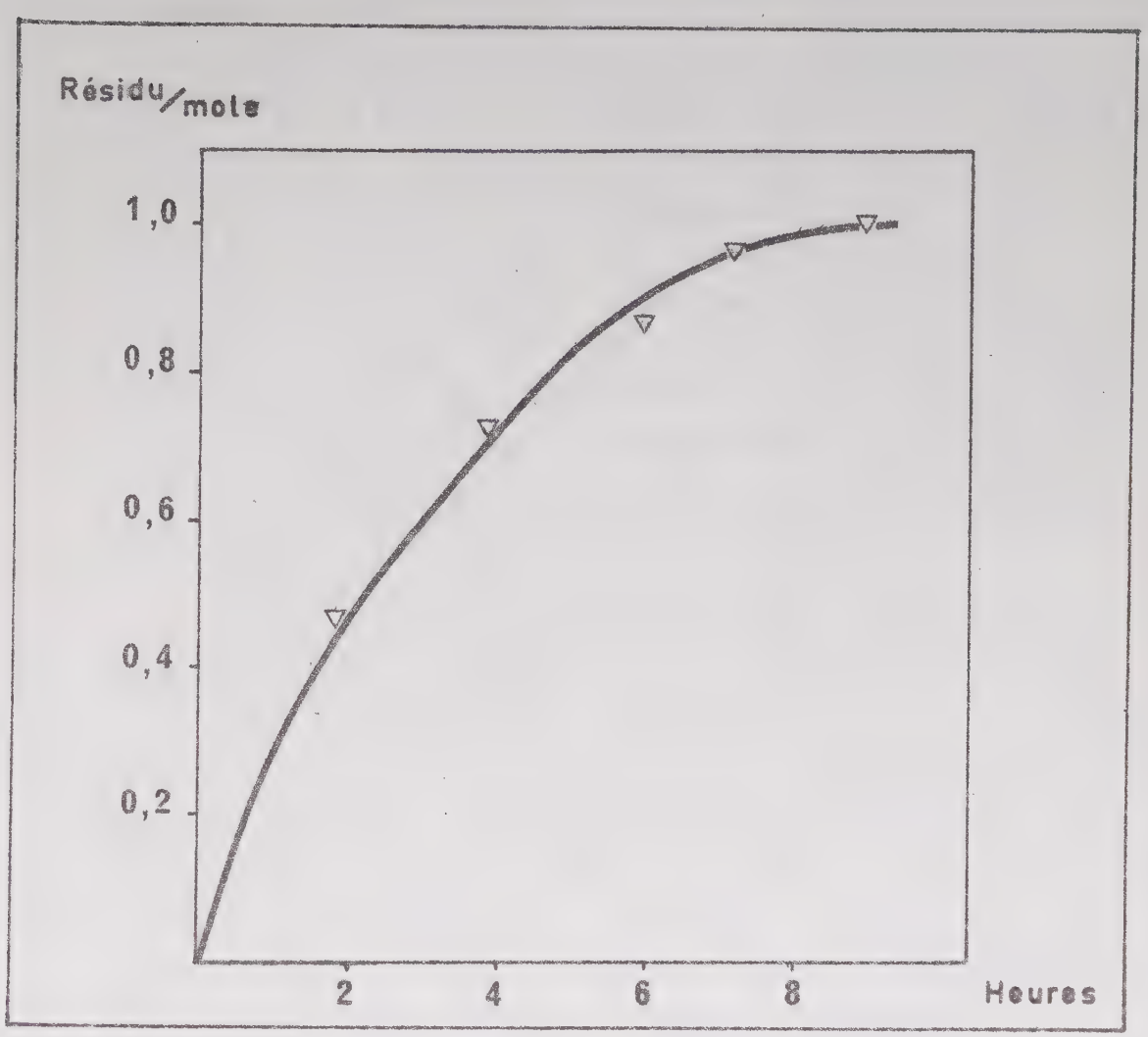


Fig. 10 - Titrage spectrophotométrique à 428 nm des résidus 3-nitrotyrosyles libérés par action de la carboxypeptidase A sur la chymotrypsine en fonction du temps

On peut constater qu'après 7 heures de traitement par la carboxypeptidase A, le résidu 3-nitrotyrosyle 146 est libéré à 90 %, dans le milieu réactionnel.

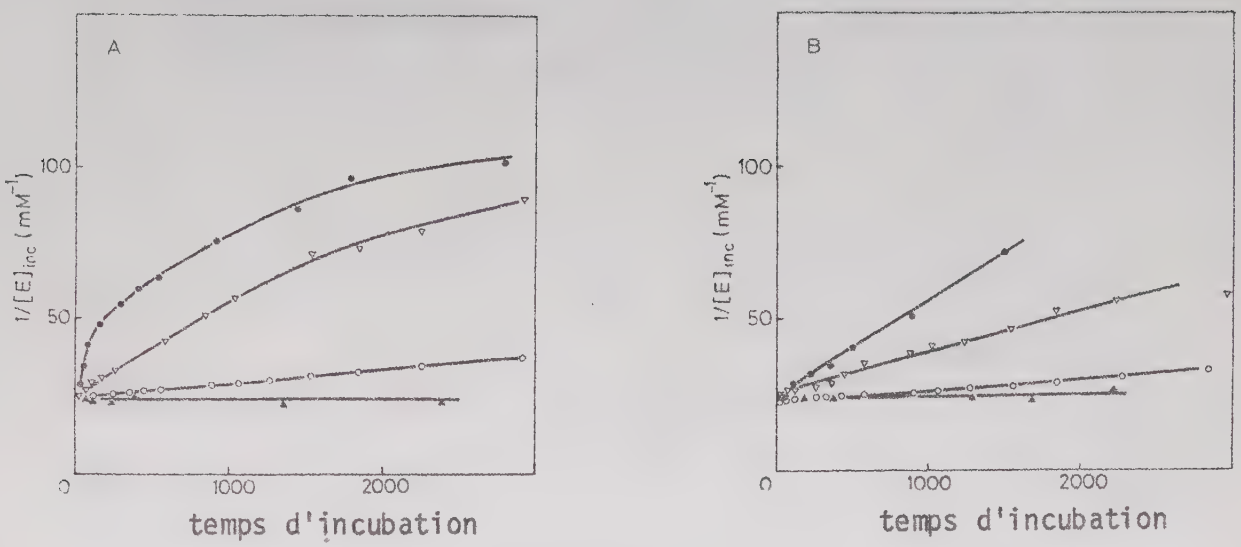
3.3.3. Stabilité des chymotrypsine α et chymotrypsineδ nitrées en fonction du pH

L'instabilité des formes nitrées en fonction du pH a pu être constatée au cours d'un essai d'obtention de formes homogènes : un essai de purification de la chymotrypsine α nitrée a été effectué par chromatographie d'affinité (CUATRECASAS et Coll. 1969). La protéine, obtenue après désorption de l'agarose substitué par l'ε-amino-caproyl-D-tryptophane méthylester à l'aide d'acide acétique dilué, ne présente que 22 % d'enzyme active par titrage des sites actifs. L'activité envers le substrat spécifique N-benzoyl-L-tyrosine-éthylester subit une décroissance semblable, en comparaison de celle de la chymotrypsine α native. Il a également été observé que la chymotrypsine α nitrée perd son activité à la suite d'un dessalage dans HCl 10^{-3} M.

Ces différences entre les formes native et substituée de l'enzyme ont suscité une étude de stabilité.

L'inactivation, en fonction du temps, à un pH donné, est mesurée en termes de changement dans les constantes cinétiques ainsi que l'ont décrit KUMAR et HEIN (1970).

Pendant le temps d'incubation, K_m est pratiquement inchangé, les valeurs obtenues se situant entre 0,9 et 1,2 mM pour l'enzyme native. Une décroissance continue de V_{max} est observée. Si l'on postule que la constante de vitesse k_{cat}, pour l'hydrolyse de l'ester est constante, la quantité d'enzyme active dans l'essai, et donc dans le milieu d'incubation, peut être obtenue en divisant V_{max} mesuré par k_{cat} (130 s^{-1} pour la chymotrypsine α nitrée, 150 s^{-1} pour la chymotrypsine α).



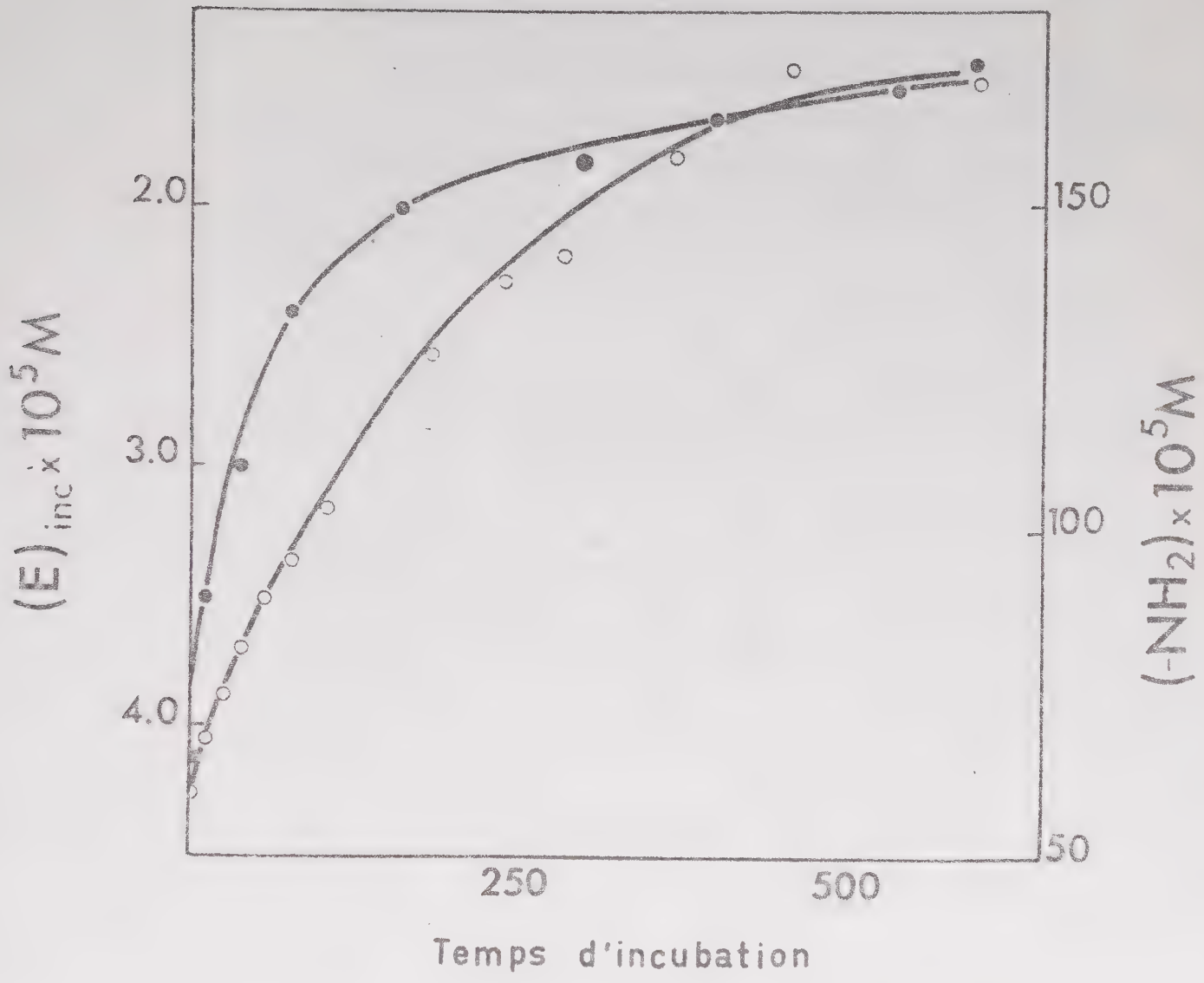
(●) pH 8,5 0,1 M Tris HCl
(▽) pH 8,0 "-"
(○) pH 7,5 "-"
(▲) pH 5,0 0,1 M Acétate de sodium

Fig. 11 - Représentation de $1/[E_{inc}]$ vs temps d'incubation de la chymotrypsine α (B) et de la chymotrypsine α nitrée (A) à 30°C et différents pH

L'inactivation de la chymotrypsine α nitrée à pH 8,5 est plus rapide que celle de la chymotrypsine α et présente une cinétique plus complexe (fig. 11).

A pH 8,0 la vitesse d'inactivation est encore plus grande pour l'enzyme nitrée que pour l'enzyme native mais les cinétiques sont alors toutes les deux du même ordre. A pH 7,0, la différence entre les vitesses d'inactivation est négligeable ; et à pH 5,0, les deux enzymes sont encore pleinement actives après 40 heures d'incubation (fig. 11).

Normalement la vitesse d'inactivation de la chymotrypsine α elle-même est parallèle à la vitesse de formation de produits positifs à la ninhydrine (KUMAR et HEIN 1970). Dans le cas de la chymotrypsine α nitrée l'apparition de ces produits est plus lente que la perte d'activité (fig. 12).



(○) Formation des produits ninhydrine positifs
(●) Concentration d'enzyme active (conc. intiale ≃1,0 mg/ml)

Fig. 12 - Inactivation de la chymotrypsine α nitrée à pH 8,5 et 30°C

Si les cinétiques d'inactivation sont menées à des pH acides, pH auxquels la chymotrypsine nitrée n'est pas stable, ainsi que nous l'avons mentionné au début de ce §, le phénomène est plus complexe car nous enregistrons à la fois une variation de V_{max} et de K_m. Il n'est donc pas possible de se livrer à un calcul semblable à l'expérience précédente basée sur K_m inchangé.

3.3.4. Caractéristiques cinétiques des chymotrypsines α et δ nitrées

La nitration de la chymotrypsine α double la valeur de K_m, alors que le k_{cat} demeure inchangé ainsi qu'il l'a été mesuré par l'étude cinétique de l'hydrolyse du N-acétyl-L-tyrosine-éthylester à pH 8,0 au pH mètre autotitrateur et à pH 7,0 par spectrophotométrie (tableau 3 et § *2.11*).

Enzyme	k_{cat}	K_m
	s^{-1}	mM
Chymotrypsine α nitrée	255	1,8
Chymotrypsine α	270	0,9
Chymotrypsine δ nitrée	310	0,7
Chymotrypsine δ	420	0,6

Tableau 3 - Constantes cinétiques d'hydrolyse de N-acétyl-L-tyrosine-éthylester

La dépendance des constantes cinétiques en fonction du pH a été étudiée en utilisant comme substrat le N-acétyl-L-tryptophane-méthylester. Les constantes de vitesse, k_{cat}, ne sont que peu modifiées si l'on compare les chymotrypsines α et δ nitrées aux enzymes natives correspondantes.

L'influence de la variation du pH sur K_m affecte fortement les propriétés de fixation du substrat de la chymotrypsine α nitrée par rapport à la chymotrypsine α (fig. 13 page suivante). Au fur et à mesure que le pH augmente, la chymotrypsine α perd la possibilité de fixer le substrat, alors que la forme α nitrée la conserve en partie, de la même manière que les chymotrypsines δ native et nitrée, pour lesquelles les courbes de K_m en fonction du pH sont pratiquement identiques. La nitration semble donc permettre à la chymotrypsine α de fixer le substrat à pH alcalin, quoique plus faiblement, ainsi que les formes δ nitrée et non nitrée.

Dans la zone de pH de 7,5-8,0, K_m, pour la chymotrypsine α nitrée, augmente en comparaison de la chymotrypsine α et des chymotrypsines δ nitrée et native. Cela peut être dû à un effet de déprotonation du résidu nitro-tyrosyle (RIORDAN et Coll. 1967 , SOKOLOVSKY et Coll. 1966).

3.3.5. *Interaction de la chymotrypsine α nitrée et de la chymotrypsine δ nitrée, de leurs formes non substituées, avec l'inhibiteur pancréatique de la trypsine*

Les chymotrypsine α et δ nitrées forment un complexe mole à mole avec l'inhibiteur trypsique du pancréas ainsi qu'on peut le montrer en isolant les différents complexes enzyme-inhibiteur par filtration sur gel et dosage de la quantité d'inhibiteur lié selon la méthode de KEIL-DLOUHA et KEIL (1969).

Les constantes de vitesse des réactions d'association et de dissociation de l'enzyme avec l'inhibiteur sont influencées par la nitration (tableau 4).

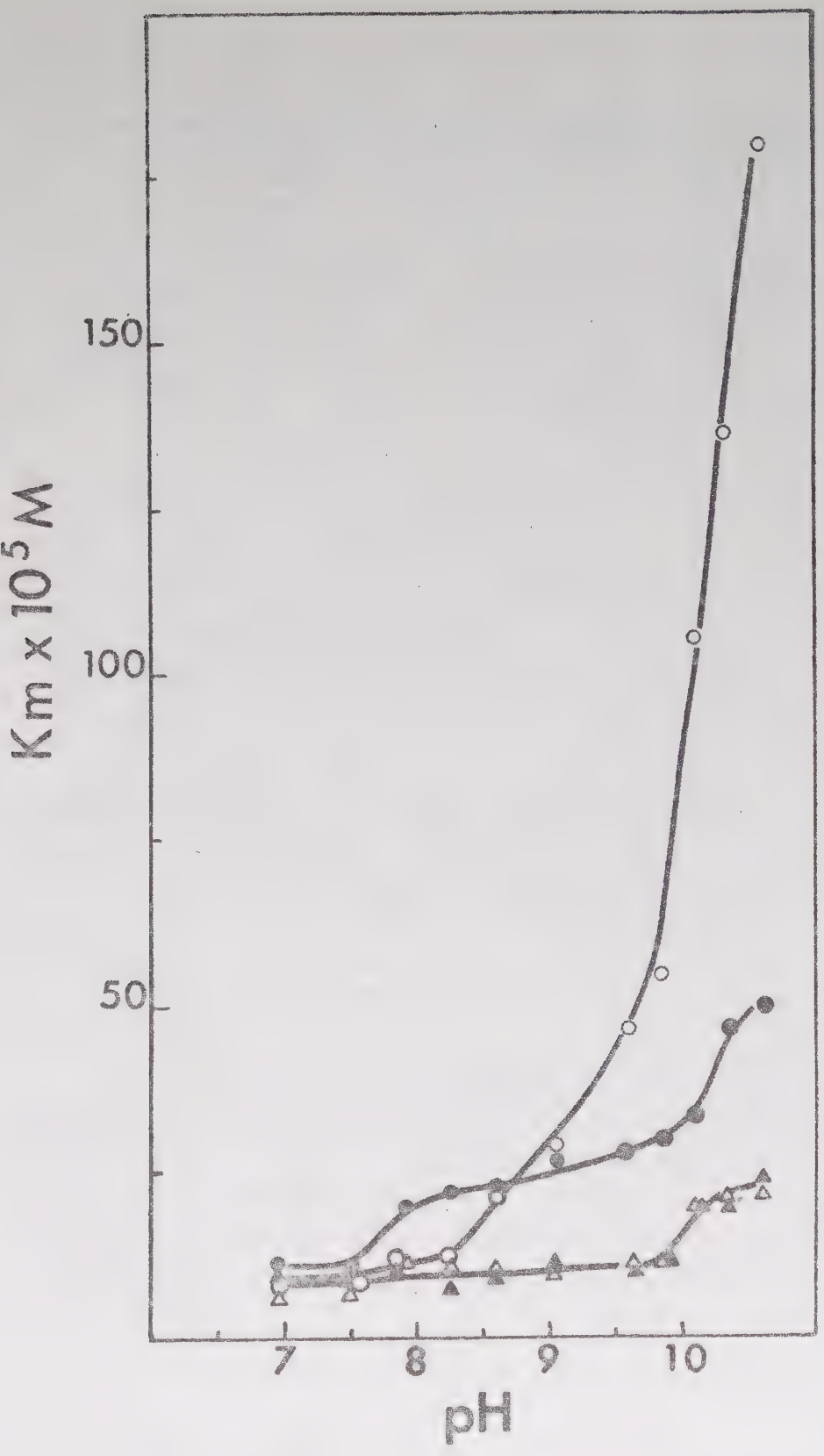


Fig. 13 - Courbes K_m/pH de la chymotrypsine α nitrée (●), de la chymotrypsine α (○), de la chymotrypsine δ nitrée (▲) et de la chymotrypsine δ (△), hydrolyse du N-acétyl-L-tryptophane méthylester

Chymotrypsine	k_a	k_d	(EI)	K_d
	MM^{-1} s^{-1}	ks^{-1}	nM	nM
α native	0,8	0,9	2,5	1,1
α nitrée	0,4	4,2	300	10,5
δ native	0,7	2,3	300	3,3
δ nitrée	0,6	2,9	80	4,8

k_a : constante de vitesse d'association
k_d : constante de vitesse de dissociation
K_d : constante de dissociation
(EI): concentration du complexe

Tableau 4 - Paramètres cinétiques pour l'association et la dissociation des chymotrypsines α, δ et de leurs formes nitrées avec l'inhibiteur trypsique du pancréas

Le k_a décroît et le k_d augmente, en comparaison des constantes de vitesse obtenues pour les formes non substituées respectives. La constante de dissociation, K_d, qui en résulte, augmente donc, notablement plus dans le cas de la chymotrypsine α nitrée. Le complexe inhibiteur-chymotrypsine α nitrée est par conséquent moins stable que le complexe correspondant avec l'enzyme native.

3.3.6. Spectres de différence des formes nitrée et native des chymotrypsines α et δ.

Une modification de la conformation d'une protéine, si elle provoque une perturbation de l'environnement d'un résidu aromatique, amène un changement dans le spectre de la protéine. Nous avons réalisé les spectres de différence de 255 à 305 nm des

chymotrypsines α et δ nitrées et non nitrées, prises deux à deux. Ces spectres sont réunis dans la figure 14 (voir page suivante).

Il peut être constaté que les formes α et δ (courbe A) ne présentent pas de différence sensible dans les zones d'absorption des résidus tyrosyles et tryptophanyles (280 et 289 nm). Par contre, la comparaison, par différence, de la chymotrypsine α et de sa forme nitrée (courbe B) met en évidence l'apparition d'un pic à 289-290 nm, traduisant la modification de l'environnement d'au moins un résidu tryptophanyle, alors que le spectre de différence de la chymotrypsine δ et de la chymotrypsine α nitrée n'indique pas de changements de conformations aussi nets, aux niveaux des acides aminés tyrosines et tryptophanes de la molécule (courbe C).

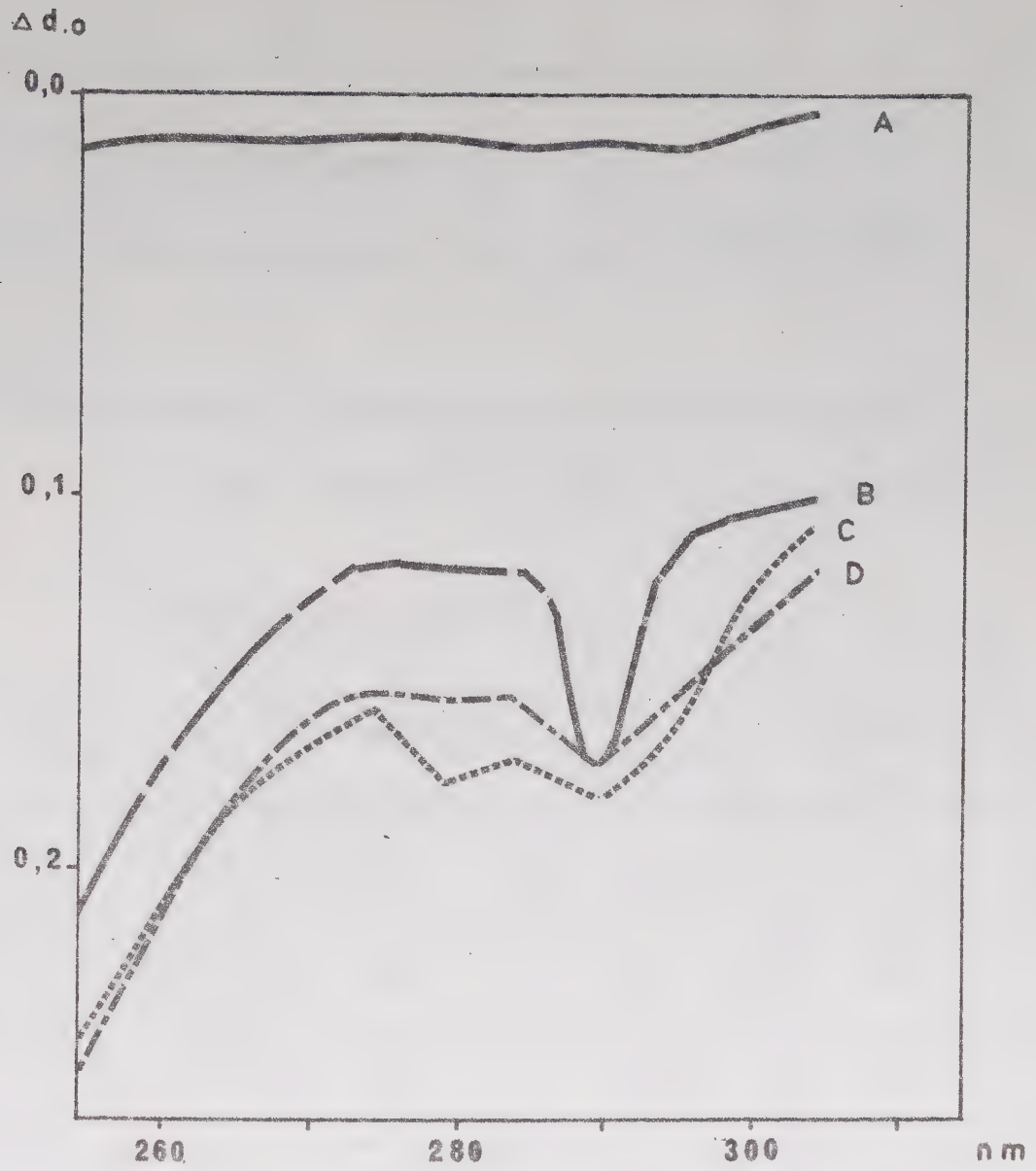
Cette même différence, quoique moins marquée, existe entre la chymotrypsine δ et sa forme nitrée (courbe D).

La nitration provoque donc un changement de conformation tel que le spectre d'absorption (de 255 à 305 nm) de la chymotrypsine α nitrée se rapproche de celui de la chymotrypsine δ.

3.3.7. Comparaison de la spécificité des chymotrypsines α et δ nitrées avec celle des formes natives

La chymotrypsine α hydrolyse, principalement les liaisons peptidiques adjacentes au groupe carboxylique d'acides aminés aromatiques tels que tryptophane, tyrosine et phénylalanine (CUNNINGHAM 1965).

L'étude de la spécificité a été faite en comparant les cartes peptidiques obtenues à partir d'hydrolysats de la chaîne B oxydée de l'insuline par les différentes formes α et δ nitrée et native de la chymotrypsine (rapport molaire enzyme/substrat : 1/6000). Les quatre hydrolysats ont été réalisés simultanément avec des quantités identiques de substrat et d'enzyme (dosé par titrage des sites actifs). Après séparation de l'hydrolysat en une carte peptidique (cf. § *2.15.*), les peptides sont élués et leur composition en acides aminés est déterminée, les résultats sont présentés dans les tableaux 5 et 6.



Courbe A : Chymotrypsines α et δ
B : Chymotrypsine α et chymotrypsine α nitrée
C : Chymotrypsine δ et chymotrypsine α nitrée
D : Chymotrypsine δ et chymotrypsine δ nitrée

Fig. 14 - Spectres de différence des chymotrypsines α et δ nitrées et natives

1 ↓ 2
Phe_Val_Asp_Gln_His_Leu_Cys_Gly_Ser_His_Leu_Val_Glu_Ala_

16 ↓ 17 24 ↓ 25 ↓ 26 ↓ 27
Leu_Tyr_Leu_Val_Cys_Gly_Glu_Arg_Gly_Phe_Phe_Tyr_Thr_

Pro_Lys_Ala.

Les flèches indiquent les liaisons peptidiques hydrolysées.

Tableau 5 - Séquence de la chaîne B oxydée de l'insuline

	Chymotryp. α	Chymotryp. α nitrée	Chymotryp. δ	Chymotryp. δ nitrée
Phe 1 _ Val 2	5 %	3	3	8
Tyr 16 _ Leu 17	62	44	89	83
Phe 24 _ Phe 25	_	11	21	25
Phe 25 _ Tyr 26	95	86	75	64
Tyr 26 _ Thr 27	5	3	3	3

N.B. : les valeurs représentent le pourcentage de liaison hydrolysée par rapport au total de chaîne B de l'insuline

Tableau 6 - Rendement d'hydrolyse des liaisons peptidiques de la chaîne B oxydée de l'insuline

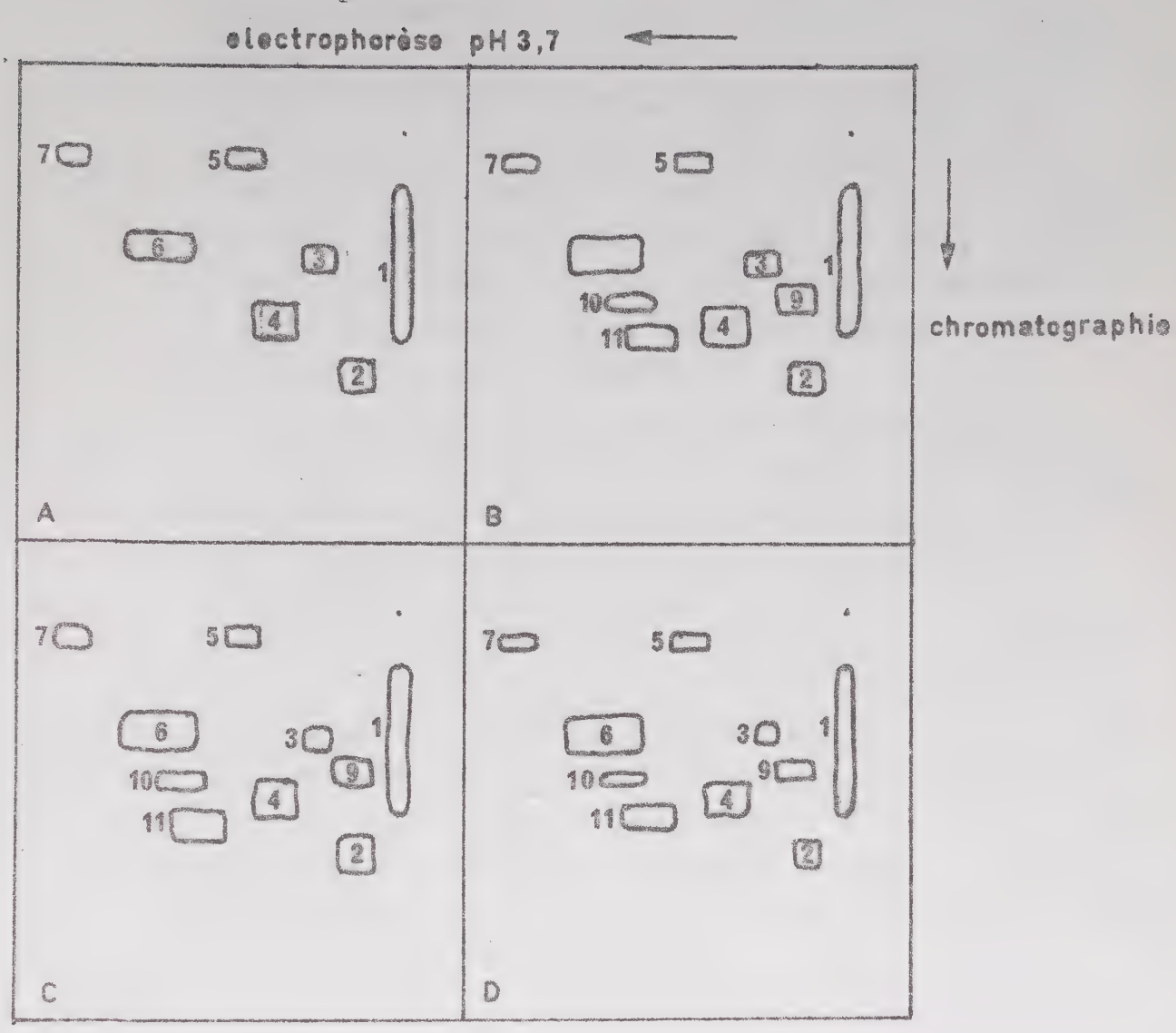
Le tableau 6 indique les liaisons peptidiques hydrolysées par les différentes formes de chymotrypsine. Il apparaît très nettement que les enzymes nitrées (chymotrypsine α-NO_2, δ-NO_2) ne présentent pas de spécificité différente des enzymes natives dont elles dérivent. Seules les liaisons peptidiques impliquant un résidu tyrosyle ou phénylalanyle sont hydrolysées.

Cependant il existe, dans les conditions expérimentales décrites, une différence entre le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées par la chymotrypsine α et par la chymotrypsine δ. Pour le même temps d'hydrolyse (i.e. 8 heures), la chymotrypsine δ scinde, dans une proportion d'environ 20 %, une liaison de plus (Phe 24 - Phe 25) que la chymotrypsine α (fig. 15 page suivante et tableau 6).

De même, la forme nitrée de la chymotrypsine α, mais aussi de la chymotrypsine δ , hydrolyse, dans le même temps, cette liaison Phe 24 - Phe 25 alors que la forme α native ne le fait pas.

Cela se traduit par l'apparition de trois peptides nouveaux, indiqués par les numéros 9, 10 et 11 sur les cartes peptidiques, B, C et D * (fig. 15 page suivante).

* Remarque - Nous avons obtenu trois peptides, au lieu de deux, du fait de l'oxydation partielle des tyrosines dans la préparation commerciale de la chaîne B de l'insuline, consécutive à la scission oxydative des ponts disulfures de la protéine ; il en est de même du peptide n° 7 dont la composition en acides aminés est identique à celle du peptide n° 6 mais pour lequel l'oxydation du résidu tyrosyle se traduit par l'apparition d'un pic anormal à l'analyse de la composition en acides aminés.



A) Chymotrypsine α
B) Chymotrypsine α nitrée
C) Chymotrypsine δ
D) Chymotrypsine δ nitrée

Fig. 15 - Cartes peptidiques des hydrolysats de la chaine B de l'insuline

3.4. Discussion

La réaction du tétranitrométhane avec la chymotrypsine α et le chymotrypsinogène permet la nitration des tyrosines en positions 146 et 171. Ce résultat est conforme, pour la chymotrypsine α, avec celui trouvé par SHLYA PNIKOV et Coll. (1968). En abaissant la concentration de réactif et en évitant les pH inférieurs à 7,0, dans la mesure du possible (SOKOLOVSKY et RIORDAN 1970), nous avons pu éviter la perte de résidus tyrosyles constatée par différents auteurs lors de la nitration (HOLEYSOVSKY et Coll. 1969 , VINCENT et Coll. 1970), perte correspondant à la formation de liaisons intra ou intermoléculaire entre tyrosines sous l'action du tétranitrométhane.

Nous n'avons pu par contre, pour le chymotrypsinogène, obtenir la nitration du résidu tyrosyle 94, résultat observé par SHLYALPNIKOV et Coll. (1968). La comparaison des études de diffraction aux rayons X n'a pas permis de révéler de différences structurales importantes à proximité du résidu Tyr 94 entre le zymogène et l'enzyme (FREER et Coll. 1970). La substitution préférentielle des résidus tyrosyles 146 et 171, que nous avons obtenus, peut être expliquée par l'utilisation d'une concentration en tétranitrométhane inférieure, conformément aux recommandations de VINCENT et Coll. (1970). Par là même, la réaction de nitration des deux groupes phénoliques a lieu plus lentement que publié par SHLYALPNIKOV et Coll. (1968), ce qui ne nous a pas permis d'obtenir une nitration significative de Tyr 94.

Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux précédents sur la réactivité des groupes phénoliques dans la chymotrypsine α et le chymotrypsinogène (HACHIMORO et Coll. 1965, WILCOX 1958 , HAVSTEEN et Coll. 1962 , DELAAGE et Coll. 1968 , RIORDAN et Coll. 1965) et les déterminations de structure par cristallographie aux rayons X (MATTHEWS et Coll. 1967 , BIRKTOFT et Coll. 1970), toutes indiquant une réactivité normale et un accès facile de deux tyrosines.

Nous avons pu montrer que l'activité catalytique de la chymotrypsine α n'est pas fortement affectée par la nitration de

deux résidus tyrosyles sur quatre :

- la constante de vitesse, k_{cat}, pour l'activité estérasique reste inchangée ;
- K_m n'est accru que d'un facteur deux par la substitution ;
- la constante de dissociation, K_d, du complexe chymotrypsine α nitrée - inhibiteur trypsique du pancréas, est augmentée de dix fois, alors que cette même constante reste inchangée si le complexe est formé par la chymotrypsine δ nitrée et l'inhibiteur.

Nous avons cherché à expliquer ces résultats d'après nos connaissances des structures tertiaires et primaires des chymotrypsines α et δ.

Des deux résidus tyrosyles nitrés, seul le résidu 146 se trouve au voisinage du site actif. Nous pensons que les effets de la nitration sur les interactions entre enzyme et substrat ou inhibiteur sont dus à la substitution du résidu tyrosyle 146.

Cette hypothèse peut recevoir un support dans la différence observée entre les effets faibles mais réels, de la nitration sur l'activité de la chymotrypsine α et leur absence pour la chymotrypsine δ . Ceci peut être relié à la différence de structure primaire entre ces deux enzymes : la chymotrypsine α diffère de la chymotrypsine δ par la perte du dipeptide Thr 147 - Asn 148, où seul est impliqué le résidu tyrosyle 146. Ceci suggère que la nitration de la tyrosine 146 est seule responsable des changements observés dans les propriétés enzymatiques de la chymotrypsine α.

L'effet le plus marqué de la nitration de la chymotrypsine α que nous ayons pu mettre en évidence concerne la capacité de fixer le substrat à pH alcalin de façon semblable à la chymotrypsine δ non nitrée et nitrée. La chymotrypsine α subit un changement de conformation dépendant d'une ionisation de pK 8,8 (OPPENHEIMER et Coll. 1966 , HESS et Coll. 1970 , FERSHT 1972). Une même dépendance a été publiée pour la capacité de fixation de substrats spécifiques et d'inhibiteurs compétitifs qui décroît avec une augmentation du pH et tend vers zéro pour des pH supérieurs à 10 (HIMOE et Coll. 1967 , VALENZUELA et Coll. 1970). Le pK de 8,8 a été attribué à l'acide aminé NH_2 terminal Ile 16 supposé former

un pont salin avec le groupe α-carboxylique de Asp 194. Dans la chymotrypsine δ , où l'existence de ce pont est très probable, la déprotonation de Ile 16 n'entraîne pas la perte de la capacité de fixation du substrat.

KAPLAN (1971) suggère que les interactions électrostatiques de Ile 16 et les interactions hydrophobes des chaînes latérales de Tyr 146 et Ala 149 sont importantes pour l'activité enzymatique. Le facteur prédominant serait dans la chymotrypsine α la liaison saline Ile 16 - Asp 194 tandis que dans la chymotrypsine δ l'importance des forces hydrophobes, du fait de l'absence de scission du dipeptide Thr 147 - Asn 148, permettrait d'éviter la perte de fixation du substrat ou de l'inhibiteur lors de la déprotonation de Ile 16.

L'effet de la nitration du résidu tyrosyle 146 est, peut être, d'augmenter les interactions de la chaîne polypeptidique à laquelle est lié le résidu Tyr 146 et d'autres parties de la molécule proche de Ala 149 et ainsi de rendre la structure tridimensionnelle moins sensible aux changements de conformation provoqués par la déprotonation de Ile 16.

Ces interactions permettraient ainsi le maintien d'une conformation plus proche de la chymotrypsine δ dans laquelle le résidu tyrosyle 146 est lié dans la chaîne peptidique et pour laquelle la nitration ne semble pas provoquer de modifications sensibles de conformation.

Nous avons cherché à confirmer cette hypothèse de rapprochement des conformations des chymotrypsines α et δ, par une étude spectrophotométrique des différentes formes de chymotrypsine et en comparant les cartes obtenues à partir des hydrolysats de la chaîne B oxydée de l'insuline.

Les spectres de différence, quoique ne permettant d'observer que les changements survenus au niveau des résidus tyrosyles et tryptophanyles indiquent une modification de la conformation lors de la nitration de la chymotrypsine α ; la conformation de la chymotrypsine α nitrée obtenue ne semble pas présenter de différence fondamentale avec la chymotrypsine δ .

De même, la comparaison des cartes peptidiques indique un rapprochement des conformations des sites de fixation du substrat de la chymotrypsine δ et de la chymotrypsine α nitrée, situation traduite par la présence d'une coupure peptidique supplémentaire par rapport à la chymotrypsine α.

Cette augmentation du nombre de scissions ne peut être mise au compte d'un accroissement de l'activité de la chymotrypsine α nitrée, car la constante de vitesse k_{cat} reste inchangée et que K_m est au contraire accru d'un facteur deux.

Les taux d'hydrolyse obtenus au niveau des différents résidus aromatiques sont en accord avec l'existence de sous-sites de fixation postulée, d'après les études cristallographiques, par SEGAL et Coll. (1971). Ces auteurs ont identifié trois sous-sites S_1, S_2 et S_3 correspondant à la fixation de trois résidus P_1, P_2 et P_3 d'une chaîne polypeptidique. P_1 correspond, ici, à un résidu aminoacyle aromatique, dont la liaison peptidique est rompue au niveau du groupe carboxylique par la chymotrypsine α.

Partant de leurs résultats, un "bon" substrat de la chymotrypsine aurait la séquence suivante :

$$\left\{\begin{matrix}\text{Gly}\\ \\ \text{Ala}\end{matrix}\right\} - X - \left\{\begin{matrix}\text{Phe}\\ \\ \text{Tyr}\end{matrix}\right\}$$

$$P_3 \quad P_2 \quad P_1$$

X étant un résidu hydrophobe (NEIL et Coll. 1966) et les forces de liaisons de P_1 avec S_1 étant beaucoup plus faibles que celles de P_3 avec S_3.

En fonction de ces conclusions, on peut donc voir que dans la chaîne B de l'insuline, les séquences Ala 14 - Leu 15 - Tyr 16 et Gly 23 - Phe 24 - Phe 25 constituent de "bons" substrats : 62 % et 95 % de ces liaisons sont hydrolysées. Par contre, la séquence Phe 24 - Phe 25 - Tyr 26 - où P_3 est un résidu hydrophobe, Phe 24, d'encombrement relativement grand

4 - INFLUENCE DE LA MODIFICATION DES RESIDUS TYROSYLES DE LA TRYPSINE

4 . INFLUENCE DE LA MODIFICATION DES RESIDUS TYROSYLES DE LA TRYPSINE

4.1. Introduction

Un nombre important de travaux a été consacré à l'étude de la réactivité chimique et de l'environnement des résidus tyrosyles de la trypsine.

La plus grande partie de ceux-ci a été effectuée avant la séparation, par SCHROEDER et SHAW en 1968, de la trypsine commerciale cristalline en plusieurs constituants dénommés, pour les formes actives α, β et ψ.

Cependant les résultats obtenus auparavant permettent d'établir une classification de la réactivité des tyrosines.

Selon les auteurs, cinq à six résidus tyrosyles sur dix, sont exposés au solvant et par là même sont susceptibles de modification (INADA et Coll. 1964, DELAAGE et LAZDUNSKI 1965, RIORDAN et Coll. 1965, HACHOMORI et Coll. 1966). La détermination des résidus susceptibles d'être modifiés a été réalisée par KENNER et Coll. (1968) avec différentes concentrations de tétranitrométhane et complètée par HOLEYSOVSKY et Coll. en 1969.

Par ailleurs, GORBUNOFF (1969) détermine pour le trypsinogène l'ordre de réactivité des tyrosines accessibles au solvant vis-à-vis de deux réactifs différents : le fluorure de cyanogène et le N-acétylimidazole. Sur les cinq résidus réagissant au total, deux et trois résidus tyrosyles, respectivement pour les deux réactifs, sont substitués plus rapidement.

4.1.1. Analyse des résultats

Les résultats pour le trypsinogène et la trypsine qui en dérive par coupure de l'heptapeptide NH_2 terminal sont consignés dans le tableau 7.

Selon KENNER, pour une nitration moyenne par molécule de 1,0 résidu, seuls trois résidus tyrosyles sont nitrés et pour une valeur moyenne de 3 nitrotyrosines, cinq résidus sont modifiés. L'augmentation de la quantité de tétranitrométhane n'amènerait

			Nº de séquence des résidus tyrosyles										
			11	20	28	48	82	137	158	171	212	218	Réf.
TNM/trypsine	= 20	%NO_2 tyr total	13	-	17	-	-	68	-	-	-	-	KENNER, 1968
	= 500	%NO_2 tyr total	17	-	20	14,5	-	47	-	+	-	-	idem
	= 40	%NO_2 tyr relatif	100	60	100	90	25	100	0	61	0	0	HOLEYSOVSKY 1969
					-								-
TNM/trypsinogène	= 40	%NO_2 tyr relatif	100	20	72	100	47	100	0	100	0	0	idem, 1971

TNM = tétranitrométhane ; - = non déterminé ; + = non calculé

Tableau 7 - Nitration du trypsinogène et de la trypsine d'après KENNER et Coll. (1968) et HOLEYSOVSKY et Coll.(1969-1971)

qu'un accroissement supplémentaire du taux de nitration des résidus tyrosyles 11, 28 et 137 et la substitution d'une tyrosine nouvelle : Tyr 48.

HOLEYSOVSKY obtient la nitration de 7 résidus tyrosyles sur 10, pour une valeur moyenne globale de 6 3-nitrotyrosines ; parmi celles-ci, quatre résidus ont une plus grande réactivité : 11 - 28 - 48 et 137.

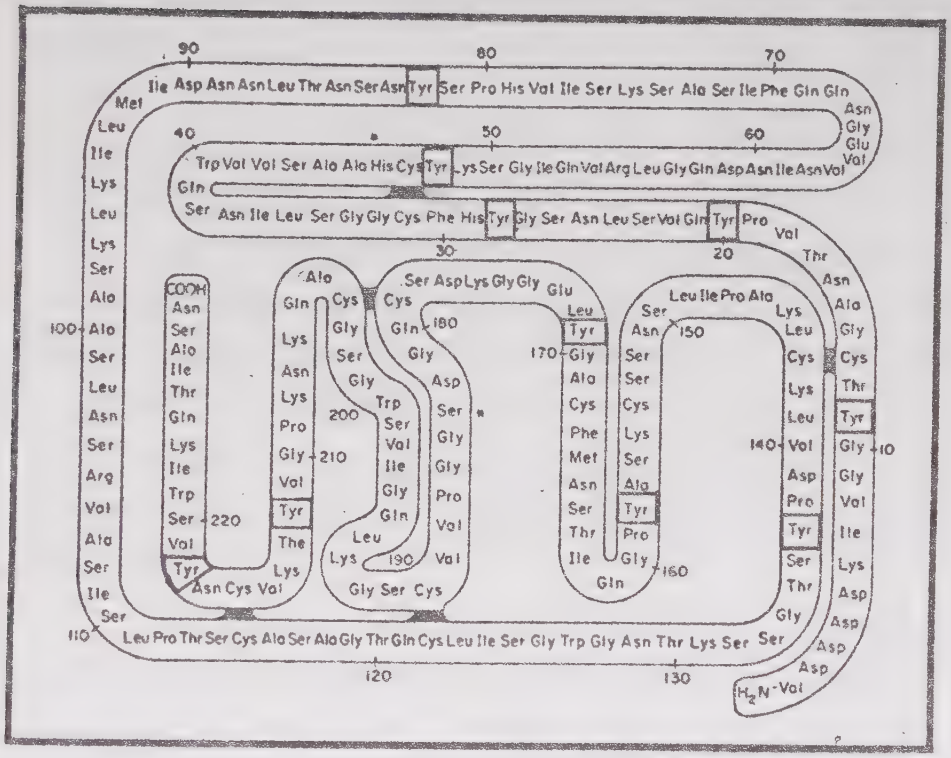


Fig. 16 - Séquence des acides aminés du trypsinogène selon B. KEIL (1971)

L'activité de la trypsine modifiée, vis-à-vis de substrats estérasiques, diminue de 25 % (KENNER et Coll. 1968) ou n'est pas

modifiée (HOLEYSOVSKY 1969).

KELLERSHOHN (1970) étudie les paramètres cinétiques de la trypsine commerciale nitrée envers différents substrats synthétiques La nitration moyenne de quatre résidus tyrosyles (trois à cinq résidus nitrés selon les expériences) n'entraîne pas de variations importantes, ni de l'activité, ni de la transition conformationnelle alcaline. Par ailleurs, les tyrosines impliquées ne font pas partie des sites de fixation de substrats spécifiques ou non spécifiques et ne jouent aucun rôle dans le phénomène d'activation par les substrats esters spécifiques. L'emplacement des tyrosines substituées dans la séquence de la protéine n'a pas été recherché par ce dernier auteur.

4.1.2. Réactions parallèles

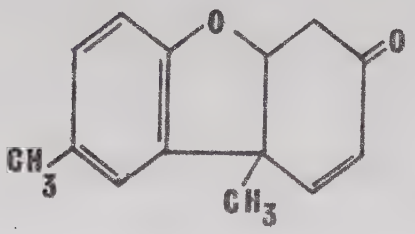
Dès 1969, HOLEYSOVSKY signale que la somme des tyrosines et des tyrosines nitrées est inférieure à la totalité des résidus tyrosyles de la molécule. Ce problème est repris, de façon détaillée, par VINCENT et LAZDUNSKI (1970).

Utilisant la trypsine commerciale pour test, ils étudient l'influence de différents paramètres sur le taux de nitration de cette protéine.

Ils observent que la concentration de la protéine en solution influe directement, à la fois, sur le nombre total de tyrosines nitrées et sur la valeur de la somme tyrosines plus tyrosines nitrées. Plus la concentration est faible, plus le nombre de tyrosines nitrées est important, et d'autant plus faible est la perte de tyrosines totales.

Les auteurs démontrent la polymérisation de la molécule par fractionnement sur carboxyméthyl cellulose. Celle-ci serait due à la formation d'une condensation des chaînes latérales de résidus tyrosyles intra ou intermoléculaires, selon un mécanisme décrit par BRUICE et Coll. (1968) pour un analogue de la tyrosine, le p-crésol,

donnant lieu à un 11-tétrahydro-6,11-diméthyl-2-oxodibenzofurane ou cétone de PUMMERER :



Par ailleurs, l'acidification du milieu, qui permet d'arrêter la réaction, provoque la transformation du produit d'hydrolyse du tétranitrométhane en acide nitreux, celui-ci est apparemment capable de modifier les chaînes latérales d'autres acides aminés de la protéine (SOKOLOVSKY et RIORDAN 1970).

Ces deux aspects de la modification des résidus tyrosyles par le tétranitrométhane peuvent expliquer la perte d'activité constatée par différents auteurs. Cependant, dans le cas de la trypsine, VINCENT et LAZDUNSKI (1970) indiquent que la présence d'un inhibiteur compétitif, la benzamidine, permet d'empêcher tout abaissement de l'activité estérasique, ramenée à 100 % de sites actifs, au cours de la substitution, quoique la formation de polymères, observée par filtration sur colonne de Sephadex G-100, entraîne une perte d'environ 25 % de l'activité estérasique, pour le dimère nitré isolé.

Il est intéressant de noter que la nitration, selon ces auteurs, n'affecte pas les activités estérasiques ou amidasiques de la trypsine, alors que les activités envers des substrats polypeptidiques sont fortement abaissées à 4 % de l'activité initiale pour l'hydrolyse de la caséine, 6 % pour l'activation du chymotrypsinogène A. Cependant la constante de dissociation du complexe trypsine nitrée-inhibiteur trypsique du pancréas est semblable à celle du complexe avec l'enzyme non nitrée.

Il n'apparaît pas, à la lecture de cette dernière publication, que les études d'activité aient été faites sur la forme monomère purifiée de la protéine nitrée, mais sur le mélange des différentes formes, l'activité étant ramenée à 100 % d'enzyme active après dosage des sites actifs.

4.1.3. Schéma expérimental

Il nous a paru intéressant de mener ce type d'étude en partant d'une forme bien caractérisée de la trypsine, la trypsine β formée d'une seule chaîne polypeptidique de 223 acides aminés liées par six ponts disulfures.

Du fait, d'une part des caractéristiques fonctionnelles de la trypsine β , d'autre part des impératifs liés à l'emploi du tétranitrométhane pour substituer les résidus tyrosyles, nous nous sommes proposés le schéma expérimental suivant :

- la substitution de la trypsineβ par le tétranitrométhane doit se faire à un pH voisin de 8,0 pendant un temps de 90 min. Cependant, ce pH est proche du pH optimal d'activité de l'enzyme (pH 8,5), auquel on observe une autolyse importante de la protéine. Pour pallier cet inconvénient, la réaction a été effectuée en présence de benzamidine 10^{-3} M. La concentration de la protéine en solution a été abaissée autant qu'il était possible de le faire pour une expérience préparative c'est-à-dire à 2 mg par ml.

Afin de réduire au maximum les réactions parallèles dues à l'acide nitreux pouvant se former lors d'une acidification du milieu réactionnel, et à séparer cependant les différents polymères formés de la forme monomère recherchée, séparation ne pouvant se faire qu'à pH acide afin de minimiser l'autolyse, la séparation, à la fois des réactifs, des sels et des formes polymères, de la forme monomère de la trypsine a été achevée par filtration sur Sephadex G-75 dans HCl 10^{-3} M en une seule étape.

La benzamidine, fixée sur l'enzyme, est ensuite éliminée par dialyse contre HCl 10^{-3} M, pendant le temps le plus court

possible (environ 12 heures) avec changements répétés.

La forme monomère nitrée de la trypsine β est ensuite analysée :

- par spectrophotométrie. Le rapport de densité optique 428/280 nm donne le nombre de 3-nitrotyrosines par molécule ;
- par analyse de la composition en acides aminés, on obtient le nombre exact de tyrosines et de tyrosines nitrées ;
- par électrophorèse sur gel. La pureté du produit est contrôlée, dans les limites de la détection utilisée ;
- par la recherche de l'acide aminé NH_2 terminal, s'agissant d'une seule chaîne polypeptidique, un seul acide aminé NH_2 terminal doit pouvoir être détecté ;
- par dosage du nombre de sites actifs. Ce dosage permet de connaître le pourcentage de forme β dans la mesure où la méthode peut être utilisée pour une forme modifiée de la trypsine.

Cette forme nitrée de la trypsine β sert de matériel de base pour les deux aspects que nous voulons étudier :

1. position des 3-nitrotyrosines dans la structure primaire ;
2. influence de cette modification de l'enzyme sur son activité enzymatique sur des substrats synthétiques et polypeptidiques d'une part, sur les changements de spécificité possibles qui peuvent en découler d'autre part.

Du fait des résultats obtenus et de ceux déjà publiés par d'autres auteurs, nous n'avons pas abordé les études cinétiques de l'activité. Celles-ci n'auraient eu d'intérêt que si des variations importantes et différentes avaient pu être observées.

4.2. Résultats

4.2.1. Cinétiques de la nitration et purification de la trypsine β nitrée

La figure 17 permet la comparaison des vitesses de

nitration pour la trypsine commerciale Worthington et la forme β pure de la trypsine (courbes A et B), dans les conditions opératoires décrites au § *2.1.*

La courbe C représente la même réaction de nitration de la trypsine β en absence de benzamidine.

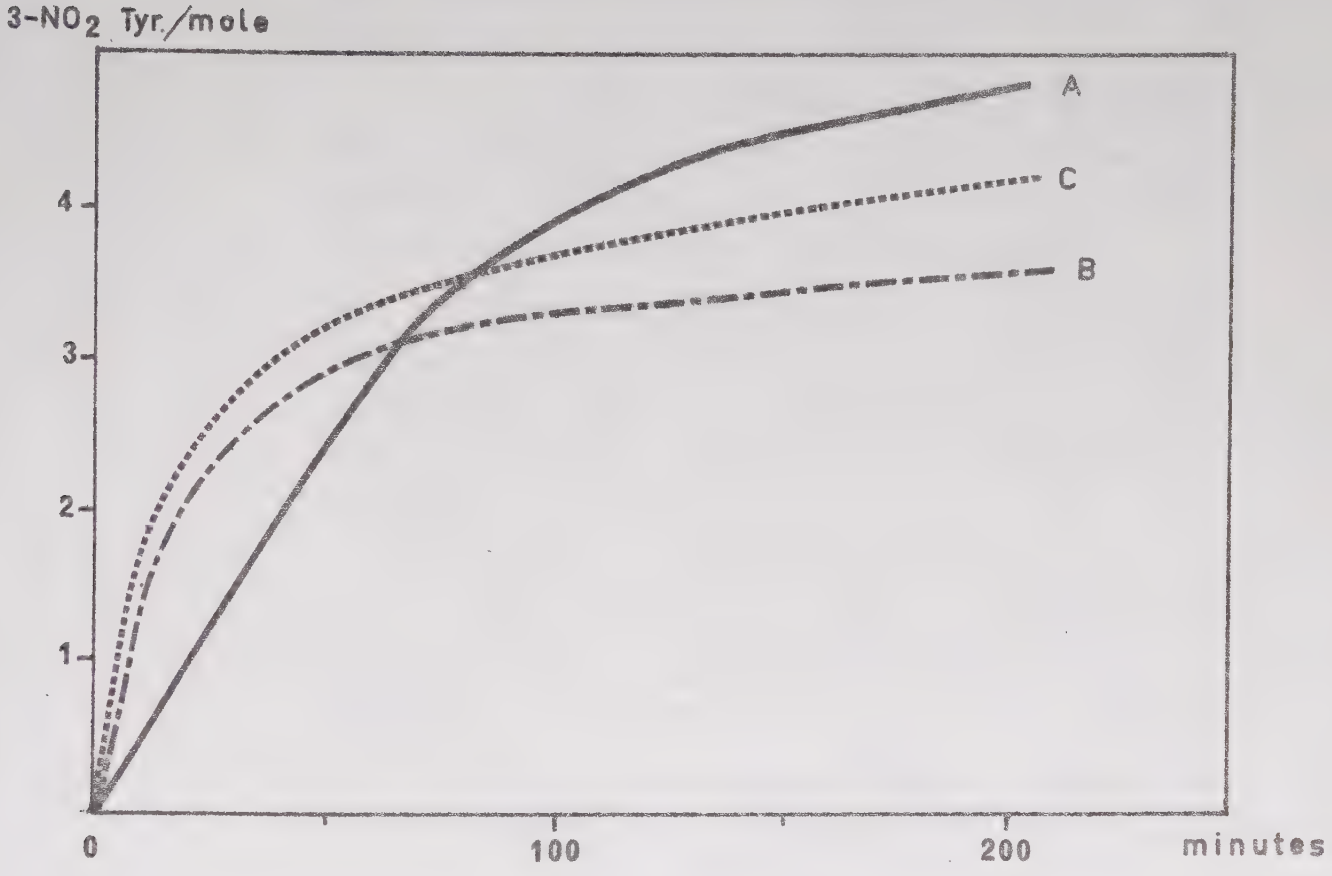


Fig. 17 - Comparaison des vitesses de nitration de la trypsine β en présence (B) et en absence de benzamidine (C) et de la trypsine commerciale (A)

Il peut être constaté que pour une durée de réaction de 90 min., dans les trois cas (A, B et C) le taux de nitration, mesuré au spectrophotomètre est sensiblement le même, et indique la présence de 3 à 4 résidus 3-nitrotyrosyles par molécule. Pour des temps supérieurs de nitration, 200 min., la trypsine commerciale contient 4,8 3-nitrotyrosines par molécule et la trypsine β tend plus lentement vers un contenu moyen de 3,6 à 4 3-nitrotyrosines par molécule.

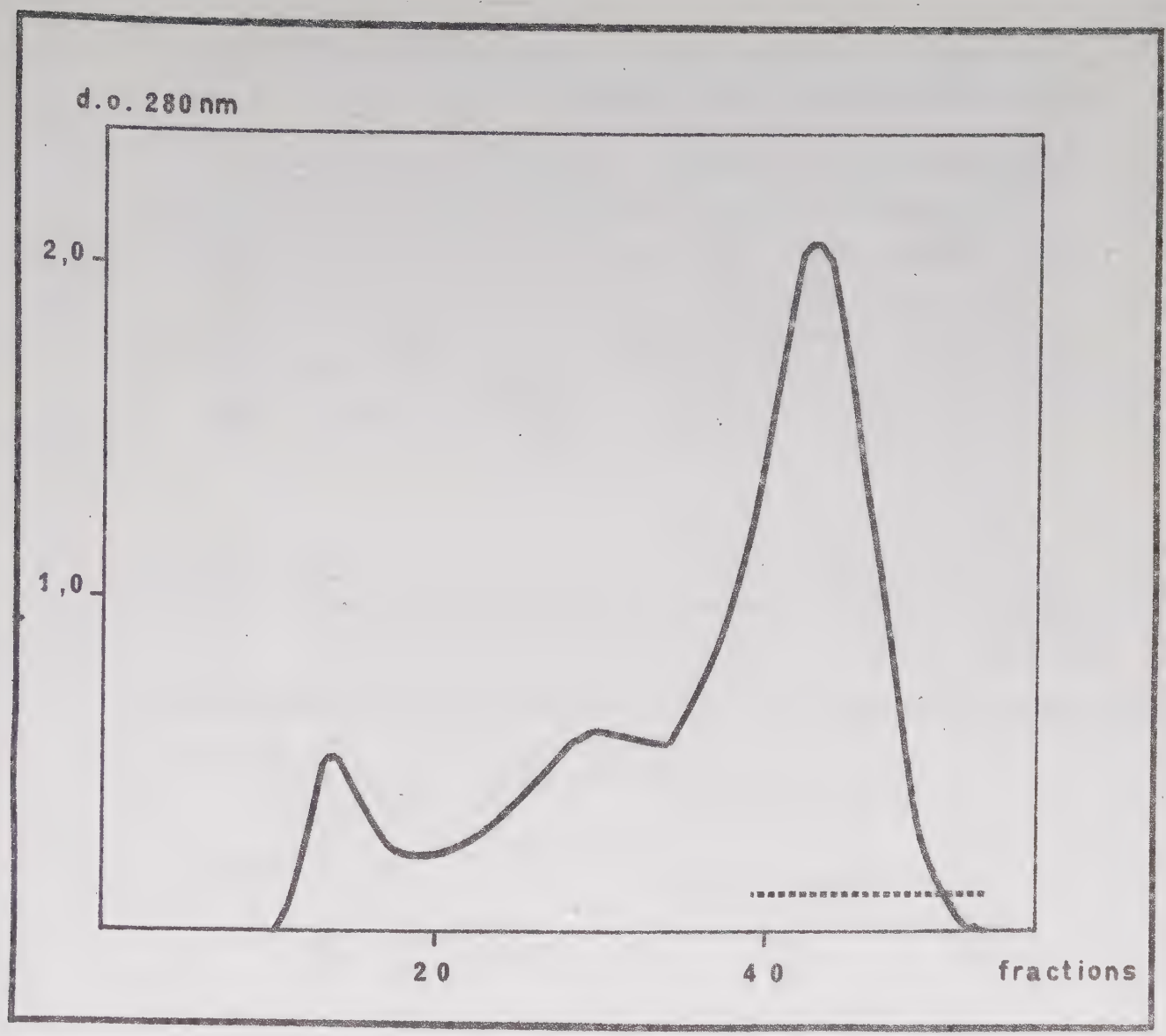
Il est à noter que l'augmentation de la concentration en tétranitrométhane par rapport à la concentration en trypsine commerciale, entraîne une vitesse de réaction plus grande et, pour un même temps, un taux de nitration plus élevé.

L'activité estérasique envers le p-tosyl-L-arginine méthylester, à la fin de la réaction, est abaissée de 25 à 30 %. Lorsque la nitration est réalisée en présence de benzamidine, mais, après purification de la forme monomère, l'activité initiale est retrouvée.

En absence de benzamidine, on peut enregistrer une perte de 40 % d'activité en fin de réaction. Le fractionnement par filtration sur gel ne permet pas de revenir au niveau d'activité initial.

La figure 18 représente l'absorbance à 280 nm de l'éluat de la filtration sur gel de Sephadex G-75. Seules les fractions soulignées d'un trait, représentant la forme monomère, sont lyophilisées, (voir page suivante).

La trypsine β a un degré de pureté de 92 %. Après nitration et séparation de la forme monomère le degré d'homogénéité de la trypsine nitrée est de 89-90 %. Le titrage, selon la méthode décrite par FOUCAULT (1972) indique que la forme monomère nitrée est constituée de 74 % de trypsine β nitrée, de 16 % de trypsine α nitrée formée par autolyse au cours de la réaction ainsi que de 9 à 10 % de produits inactifs.



(·····) fractions rassemblées correspondant à la forme monomère

Fig. 18 - Fractionnement de la trypsine β nitrée sur Sephadex G-75

Des essais de purification ultérieurs ont entraîné un très fort accroissement de la quantité de formes inactives. La forme monomère obtenue directement après nitration et filtration a été par conséquent utilisée telle quelle pour les études suivantes.

4.2.2. Taux de nitration des résidus tyrosyles des trypsines et commerciale, en présence et en absence de benzamidine

Le tableau 8 regroupe l'ensemble des résultats obtenus ; (n) et (n_1) indiquent le nombre de résidus 3-nitrotyrosyles obtenus par mesure spectrophotométrique, respectivement en fin de réaction et après purification de la forme monomérique ; (n_2) est le nombre de 3-nitrotyrosines déterminé par analyse automatique des acides aminés. Il est comparé aux valeurs obtenues pour la tyrosine et la phénylalanine

	Benzamidine 10^{-3} M	3-nitrotyrosine/mole			Tyrosine/ mole	Phénylalanine/mole
		n	n_1	n_2		
Trypsine Worthington	(+)	4,8	4,8	4,4	5,5	3,2
Trypsine β	(+)	3,2	3,1	2,8	7,0	3,0
	(-)	3,8	3,2	-	-	-

Tableau 8 - Teneur en 3-nitrotyrosines de la trypsine β

Les résultats consignés dans le tableau 8 indiquent que la somme des tyrosines nitrées et non nitrées est bien, aux erreurs d'expérience près, égale à 10, que ce soit pour la forme monomère de la trypsine β ou de la trypsine commerciale. Il n'en est pas de même si l'ensemble des fractions absorbant à 280 nm est lyophilisé et analysé. On constate alors une baisse de 30 à 40 % du nombre de tyrosines.

Par ailleurs, le dosage des sites actifs pour la trypsine commerciale nitrée monomère n'indique que 30 à 40 % de trypsine active pour 66 % avant nitration. Cette préparation pour laquelle la purification de la forme β n'a pas été effectuée contient donc des formes protéiques inactives provenant d'une autodégradation de la trypsine.

4.2.3. Identification de la position des tyrosines nitrées

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9 (voir ci-après).

Le nombre de résidus réagissant avec le tétranitrométhane est donc de quatre, et l'ordre de réactivité décroissante est : 137-28-48-11, les résidus tyrosyles 137 et 28 étant plus réactifs que les deux autres.

4.2.4. Activités estérasique et protéolytique de la trypsine β nitrée

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10

Enzymes	Bz-Arg-OEt 2 mM	Tos-Arg-OMet 2 mM	Caséine α	
			0,3 %	1 %
Trypsine β	3300	15240	828	930
Trypsine β nitrée	3120	14760	753	825

Tableau 10 - Activité estérasique et protéolytique de la trypsine β nitrée et native (en µkatal/mg)

Ces chiffres indiquent, qu'à 5 à 10 % près, la nitration des résidus tyrosyles accessibles au tétranitrométhane d'après nos conditions expérimentales n'affecte pas les activités estérasique

Composition	Quantité en nanomoles a)	Contenu relatif %	Contenu total %	Tyrosine Forme	Tyrosine n° de séquence b)
^{7}Ile-Val-Gly-Gly-NO_2Tyr^{11}	37,0	34	5,2	NO_2 Tyr	11
Ile-Val-Gly-Gly-Tyr	73,0	66			
^{21}Gln-Val-Ser-Leu-Asn-Ser-Gly-NO_2Tyr^{28}	34,2	72,7	31,6	NO_2	28
^{25}Asn-Gly-Ser-Gly-NO_2Tyr^{28}	155,4				
^{25}Asn-Gly-Ser-Gly-NO_2Tyr	32,5				
^{21}Gln-Val-Ser-Leu-Asn-Ser-Gly-Tyr^{28}	16,8	27,3		Tyr	
^{25}Asn-Gly-Ser-Gly-Tyr^{28}	66,6				
^{41}Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-NO_2Tyr^{48}	80,7	74	11,4	NO_2	48
Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr	28,3	26		Tyr	
^{132}Ser-Ser-Gly-Thr-Ser-NO_2Tyr^{137}	362,6	98	51,6	NO_2	137
Ser-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr	7,4	2		Tyr	

Tableau 9 - Peptides contenant des résidus tyrosyles, isolés de la nitrotrypsine

a) La quantité de peptide isolé est calculée d'après sa composition en acides aminés. Les pertes dues aux divers fractionnements par les techniques sur papier représentent 75 %.

b) Le système de numérotage est celui utilisé pour le trypsinogène

ou protéolytique de la trypsine β .

4.2.5. Spécificité de la trypsine β nitrée

Au vu des résultats du § précédent, il est vraisemblable que la spécificité de la trypsine β n'est pas affectée, en qualité et quantité, par la nitration de certains de ses résidus tyrosyles. Nous avons cependant voulu en faire le contrôle, afin de pouvoir comparer les effets de la nitration de la trypsine et de la chymotrypsine.

Dans les conditions expérimentales décrites au § *2.15.* seules deux liaisons peptidiques de la chaîne B oxydée sont hydrolysées, donnant ainsi deux peptides et un acide aminé libre.

1. Phe 1 - Arg 22
2. Gly 23-Lys 30 coloré en jaune par la ninhydrine
3. Ala 31

Le peptide Gly 23-Lys 30 a été isolé et élué à partir des deux hydrolysats de la chaîne B oxydée de l'insuline par action de la trypsine β et de la trypsine β nitrée. L'analyse de la composition en acides aminés a été effectuée.

La quantité d'Ala 31 a été obtenue par analyse directe des hydrolysats, sans hydrolyse acide.

Enzyme	Gly 23-Lys 30		Ala 31	
	Quantité (nmoles)	Rendement d'hydrolyse	Quantité (nmoles)	Rendement d'hydrolyse
Trypsine β	41	43,6	43,6	46,3
Trypsine β nitrée	31	33	32	34

Tableau 11 - Rendement d'hydrolyse de la chaîne B de l'insuline par les trypsines β et β nitrée

Le rendement d'hydrolyse de la trypsine nitrée par rapport à la trypsine β native est, par conséquent, proche de 75 %. Il n'y a pas de changement de spécificité et la nitration de quatre résidus tyrosyles de la trypsine β n'introduit pas de différence notable entre les vitesses d'hydrolyse des liaisons peptidiques de la chaîne B de l'insuline.

4.3. Discussion

La réaction du tétranitrométhane avec la trypsine β permet la nitration des tyrosines en position 11, 28, 48 et 137. Ce résultats est conforme avec celui trouvé par KENNER et Coll. (1968), quoique ceux-ci aient observé, pour un rapport tétranitrométhane/ enzyme semblable, la substitution supplémentaire partielle du résidu tyrosyle 171.

De même, les rapports de réactivité des résidus tyrosyles sont semblables à ceux trouvés par GORBUNOFF (1969) pour le trypsinogène par la substitution à l'aide du fluorure de cyanogène : sur les quatre résidus pouvant réagir deux sont substitués plus rapidement, les deux autres pouvant être distingués entre eux par une réactivité décroissante de l'un à l'autre.

La comparaison des vitesses de réaction du tétranitrométhane avec la trypsine β et avec la trypsine commerciale Worthington indique très clairement que pour des temps de réaction supérieurs à 90-100 minutes, l'action du réactif a lieu sur des résidus tyrosyles de réactivité inférieure à celle des résidus nitrés durant la première partie de la substitution de la trypsine commerciale. Si la forme β pure est utilisée, ainsi que nous l'avons fait , cette nitration additionnelle de la protéine est moins importante.

Nous n'avons pu mettre en évidence l'effet protecteur de la benzamidine contrairement à VINCENT et Coll. (1970) (cf. fig. 10 et tableau 5). L'absence de cet inhibiteur compétitif dans le milieu réactionnel se traduit seulement par une perte partielle d'activité de l'enzyme et une cinétique de nitration tendant vers celle de la trypsine commerciale. Sa présence permet, pour un temps de réaction de 90 min., de minimiser l'autolyse de l'enzyme et ne semble pas modifier le taux de nitration.

Il peut donc être supposé que la nitration de résidus tyrosyles supplémentaires obtenue auparavant par différents auteurs (HOLEYSOVSKY et Coll. 1969 , VINCENT et Coll. 1970) est due à

trois conditions expérimentales différentes et complémentaires :

1° - Forme protéique insuffisamment purifiée : la totalité des études préalablement effectuées ont été réalisées sur un mélange de formes plus ou moins dégradées de la trypsine.

2° - Rapport tétranitrométhane/protéine trop élevé (HOLEYSOVSKY et Coll. 1969 : rapport TNM/enzyme : 400). Une concentration trop forte en tétranitrométhane entraîne une vitesse de réaction plus grande et favorise les réactions parasites de polymérisation intra ou intermoléculaire.

3° - Durée de la réaction trop longue : ce facteur ne fera qu'amplifier les effets préalablement décrits (durée supérieure à 90 min.).

A ceci peut être ajoutée la non-purification du monomère substitué de la protéine (KENNER et Coll. 1968 , HOLEYSOVSKY 1969).

Cependant les différences observées avec les travaux des deux auteurs, VILLANUEVA et Coll. (1971) et VINCENT et Coll. (1970), ne peuvent être directement expliquées par nos résultats. Ceux-ci notent une protection d'un groupe tyrosyle, en moyenne, par la benzamidine, VILLANUEVA dans la trypsine β par méthode de perturbation de solvant, VINCENT dans la trypsine commerciale entière par substitution chimique. Il se peut que ce masquage au solvant par un inhibiteur d'une partie des résidus tyrosyles se traduise par des proportions différentes en 3-nitrotyrosines, la somme totale des résidus tyrosyles nitrés restant inchangée. Cependant cette hypothèse peut être difficilement retenue au vu de la publication récente des travaux de cristallographie de BODE et SCHWAGER (1975). Ces auteurs ont étudié aux rayons X à 1,8 Å de résolution, la structure de la trypsine β à pH 7,0 en présence de benzamidine. Leurs conclusions indiquent que la fixation de cet inhibiteur ne modifie pas l'arrangement des chaînes polypeptidiques de la protéine et se comporte comme un substrat en se fixant par son groupement amidinium au résidu aspartyle 177.

Ce résultat est contraire à l'hypothèse formulée par KRIEGER et Coll. (1974) qui ont comparé les structures tertiaires de la trypsine inhibée par le diisopropylfluorophosphate d'une part et par la benzamidine d'autre part, mais sans comparaison avec la trypsine native ; le passage d'un inhibiteur d'encombrement stérique important fixé sur le résidu séryle 195 à un inhibiteur de moindre encombrement, la benzamidine, entraînerait un réarrangement des résidus d'acides aminés formant le site actif. Mais ce résultat ne peut être comparé avec celui correspondant au passage (trypsine β-benzamidine) - (trypsine β native) étudié par BODE et SCHWAGER (1975).

Cette absence de modification de la structure tertiaire de la protéine ne peut entraîner des variations dans l'exposition des résidus tyrosyles au solvant, donc de leur taux de nitration. Nous n'avons pas cherché à obtenir des précisions sur ce point, compte tenu de l'invariance des activités après nitration de la trypsine β.

L'activité estérasique sur substrat synthétique n'est pas modifiée lorsque la trypsine β est nitrée par le tétranitrométhane. Ce résultat concorde avec celui de VINCENT et Coll. (1970) qui n'ont pas observé de changement de V_{max} ni de K_m lors de l'hydrolyse de l' α-N-benzoylarginine éthylester par la trypsine commerciale nitrée. Les variations des paramètres cinétiques de la trypsine nitrée par rapport à la trypsine native, sur des substrats synthétiques, ont largement été étudiées par KELLERSON (1970). N'obtenant pas de résultats fondamentalement différents, nous n'avons pas repris ce travail.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que la forme monomère nitrée de la trypsine β ne présentait pas de différence importante d'activité protéolytique, que ce soit avec la caséine α ou la chaîne B de l'insuline pour substrat. Par conséquent, nous différons également sur ce point des résultats publiés par VINCENT et LAZDUNSKI (1970) qui ont pu observer un abaissement de vingt fois de l'activité protéolytique. Ceci peut d'ailleurs être relié au point de contradiction précédent : aucun résidu tyrosyle n'intervient au niveau du site de fixation et par conséquent la nitration

de résidus tyrosyles accessibles ne peut affecter la fixation de substrats protéiques.

L'abaissement important de l'activité protéolytique peut être dû à une modification du site catalytique, mais ni ces auteurs, ni nous-mêmes n'avons pu constater de variation d'activité sur substrats synthétiques.

Une explication possible serait que la mesure des activités ayant été réalisée directement avec la trypsine commerciale nitrée, sans avoir purifié le monomère, il est ainsi enregistré la moyenne des activités protéolytiques partielles des formes polymères dont la proportion est fonction des conditions expérimentales. Sur ce point, il est intéressant de rappeler que k_{cat} du dimère, isolé par VINCENT et LAZDUNSKI (1970), testée avec le N-α-benzoylarginine éthylester n'est que de 75 % de celle de la forme monomère. L'activité sur substrat protéique du dimère n'a pas été vérifiée par ces auteurs.

Notre hypothèse est qu'il est possible de ne pas enregistrer de baisse d'activité envers des substrats synthétiques, dans le cas de polymères, contrairement à un fort abaissement de l'activité protéolytique, car l'accessibilité au site catalytique et donc du site de fixation est plus grande pour des substrats de petite taille que pour des substrats tels que la caséine α, le chymotrypsinogène ou la chaîne B oxydée de l'insuline.

L'étude des coupures effectuées sur ce dernier substrat par la forme monomère de la trypsine β confirme par ailleurs le résultat obtenu avec la caséine α. La spécificité d'hydrolyse est identique : seules les liaisons peptidiques impliquant des résidus d'acides aminés basiques sont rompues. D'autre part, les proportions de chaque liaison hydrolysée sont semblables pour la trypsine β et sa forme nitrée.

L'ensemble de ces résultats indique par conséquent que la nitration partielle ou totale de quatre tyrosines de la trypsine β n'entraîne pas de modifications sensibles de son activité. Les quatre résidus nitrés se trouvant, tous, dans des régions de la

protéine accessible au solvant, cette absence de changement d'activité semble traduire, au contraire de la chymotrypsine α, une absence d'effet de la nitration sur la conformation tridimensionnelle de la protéine.

5 - Substitution du résidu tryptophanyle 199 des trypsines α et β et comparaison avec l'élastase

5. SUBSTITUTION CHIMIQUE DU RESIDU TRYPTOPHANYLE 199 DES TRYPSINES α ET β ET COMPARAISON AVEC L'ELASTASE

5.1. Introduction

Les études sur les protéases pancréatiques présentées dans ce chapitre ont été réalisées en collaboration avec Mme V. KEIL. Nous exposons ici principalement les résultats obtenus avec la trypsine et l'élastase (J.M. IMHOFF et Coll. 1973, J.M. IMHOFF 1975) tandis que ceux, publiés indépendammant sur le trypsinogène, le chymotrypsinogène et la chymotrypsine (KEIL-DLOUHA et KEIL 1972, KATRUKHA et Coll. 1973, KEIL-DLOUHA et KEIL 1973) seront indiqués pour la compréhension du sujet.

Ainsi que nous l'avons rappelé dans l'introduction générale (cf. § *1.1.*), la trypsine est une enzyme protéolytique de poids moléculaire 23.500, de structure tertiaire très proche de la chymotrypsine, mais qui s'en différencie par la spécificité d'hydrolyse des liaisons peptidiques. La scission a lieu au niveau du groupement carboxylique en α des résidus basiques, lysyles et arginyles. Cette différence avec la chymotrypsine semble être due à la présence du résidu aspartyle 177 au niveau du site de fixation.

Le site de fixation du substrat peut être, schématiquement, assimilé à une "poche" à la surface de la molécule, très proche du résidu séryle actif 195 qui est acylé durant la catalyse.

La spécificité serait due à la présence d'une charge interne négative au fond de la cavité du site de fixation. Des contacts hydrophobes pourraient avoir lieu entre les chaînes latérales du substrat et les liaisons peptidiques des résidus séryle 188 - cystéynyle 189 et tryptophanyle 199 - glycyle 200 (STROUD et Coll. 1974).

La séquence de la trypsine comprend quatre résidus tryptophanyles en position 40 - 127 - 199 et 221, pour huit dans la séquence de la chymotrypsine.

De nombreuses études antérieures ont recherché l'effet de substitutions chimiques sur l'activité de la trypsine.

Cependant, au moment où nous avons entrepris cette recherche, peu de travaux avaient été consacrés à l'étude de la réactivité, et à la détermination, après modification, de la position des résidus tryptophanyles.

Cependant, des résultats précédents, il pouvait être conclu que sur les quatre résidus tryptophanyles de la trypsine pouvant être formylés à pH acide, trois semblaient avoir une influence sur l'activité estérasique, mais non sur l'activité amidasique (COLETTI-PREVIERO et Coll. 1969). Aucun tryptophane dans le trypsinogène, ne peut être substitué sur le noyau indole par le bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyl ou réactif de Koshland à pH 8,0 (HORTON et KOSHLAND 1965 , DELAAGE et Coll. 1968). De même, en analysant la trypsine inhibée, soit par le diisopropylfluorophosphate au niveau du résidu séryle 195, soit par un inhibiteur compétitif de faible poids moléculaire la benzamidine, VILLANUEVA et HERSKOVITS (1971) par spectrométrie de différence concluaient que trois résidus tryptophanyles sur quatre étaient alors exposés au solvant. La plupart des études ont été faites sur la trypsine cristalline, c'est-à-dire sur un mélange d'au moins trois formes actives, nommées α, β ψ (SCHROEDER et SHAW 1968) représentant environ 60 % du total.

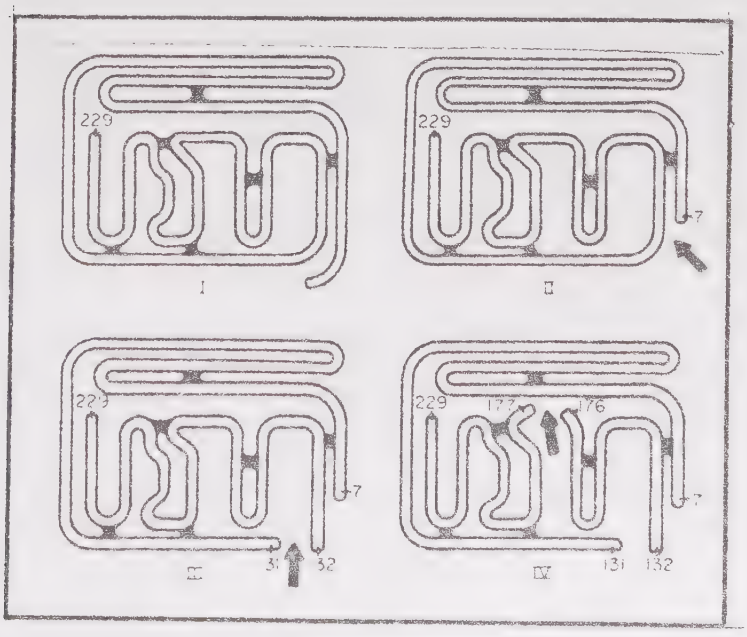


Fig. 19 - Conversion du trypsinogène (I) en trypsine β (II), trypsine α (III) et pseudotrypsine ψ (IV) d'après B. KEIL (1971)

Ces différentes formes proviennent de l'autodégradation de l'enzyme.

Pour cette raison, il est difficile d'interpréter les expériences concernant les relations entre la structure et la fonction de l'enzyme lorsque la trypsine cristalline a été utilisée.

Il nous a, par conséquent, semblé utile de reprendre l'étude de l'effet éventuel de la modification de résidus tryptophanyles sur l'activité et la structure d'une forme bien caractérisée de la trypsine, la forme β et, parallèlement, lorsqu'une action différente pouvait être envisagée, sur la forme α. L'activité enzymatique est étudiée sous ses deux aspects : la catalyse, c'est-à-dire l'hydrolyse de substrats, et d'autre part la fixation de ces substrats qui est estimée par le biais de la fixation d'inhibiteurs à l'enzyme.

Au vu des résultats obtenus, nous avons également cherché à savoir si pour une structure tertiaire voisine de la trypsine et la chymotrypsine à savoir l'élastase, la réactivité de l'acide aminé tryptophane était, ou non, liée à une position particulière dans la molécule, ou à une exposition favorable au solvant.

L'élastase a, dans sa séquence, sept résidus tryptophanyles,

Enzyme	Séquence	Nombre total de tryptophanes
Chymotrypsine	Val-Ser-Trp-Gly-Ser (215)	8
Trypsine	Val-Ser-Trp-Gly-Ser (199)	4
Elastase	Thr-Ser-Phe-Val-Ser (208)	7

Tableau 12 - Comparaison des séquences des chymotrypsine, trypsine et élastase

pour huit dans la chymotrypsine et quatre dans la trypsine. Le résidu tryptophanyle 215 de la chymotrypsine, analogue à Trp 199 de la trypsine est remplacé dans l'élastase, par un résidu phénylalanyle en position 208 (tableau 12).

Par ailleurs, sur les sept résidus tryptophanyles cinq sont dans des positions analogues dans la chymotrypsine (Trp 12 - 39 - 132 - 164 et 232).

o

o o

Nous présenterons, successivement et comparativement, pour les deux protéines, les essais de substitution des résidus tryptophanyles et la localisation du résidu modifié s'il y a lieu, puis les effets de la modification sur l'activité.

5.2. Résultats

5.2.1. Influence de la substitution des tryptophanes par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle sur l'activité enzymatique des trypsines α et β .

Ainsi que le montre la figure 20, l'action du bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle provoque après 40 min. de réaction une baisse de l'activité enzymatique de la trypsine β, dosée sur le p-tosyl-L-arginine méthylester, égale à 3,5 % de l'activité initiale.

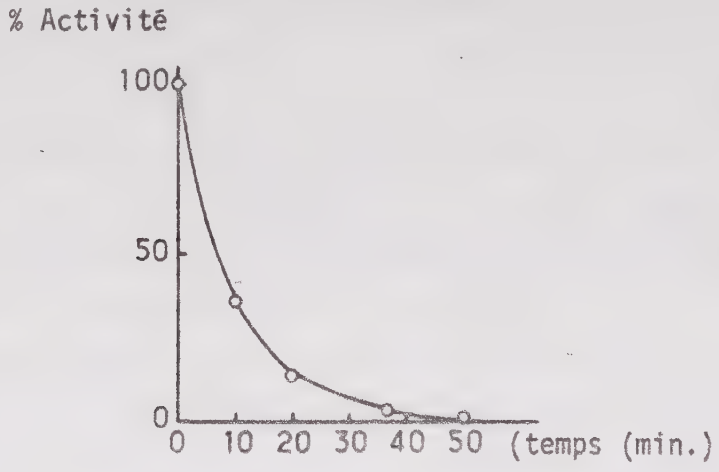


Fig. 20 - Perte d'activité de la trypsine β pendant la substitution par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle

Les trypsines α et β substituées n'ont pas non plus montré d'activité amidasique sur le N-α-benzoyl-D-L-arginine p-nitroanilide, quoique des concentrations dix fois supérieures à celles utilisées pour un dosage normal aient été employées.

Le tableau 13 donne la composition en acides aminés basiques et tryptophane déterminée par analyse automatique

Acides aminés	Trypsines α et β	Trypsine α substituée	Trypsine β substituée
Lys	14	14,6	13,3
His	3	2,9	3,3
Trp	4	2,8	3,4
Arg	2	2,0	1,9

Tableau 13 - Contenu en acides aminés basiques et résidus tryptophanyles intacts dans les trypsines α et β substituées (moles/mole d'enzyme)

Le nombre de tryptophanes non substitués, dans les trypsines α et β est, en moyenne, de 3 ± 0,25 résidus ; il n'y a par conséquent qu'un seul résidu tryptophanyle substitué par le bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyle.

Par ailleurs, la détermination des extrémités N-terminales par le réactif 2,4-dinitro-1-fluorobenzène, faite à des intervalles de 15 min. au cours de la réaction, ne permet pas de détecter l'apparition d'autres acides aminés terminaux que ceux des protéines originelles indiquant ainsi l'absence de protéolyse au cours de la réaction.

Il faut noter qu'il n'a pas été possible de doser directement le nombre de groupes 2-hydroxy 5-nitrobenzyle fixé sur la protéine après filtration sur Sephadex G-25, par mesure spectrophotométrique selon BARMAN et KOSHLAND (1967). En effet, le dérivé de l'alcool benzylique formé par hydrolyse spontanée du réactif s'adsorbe très fortement sur la protéine, et absorbe à la même longueur d'onde (410 nm) que le groupement fixé sur le résidu tryptophanyle. Il est alors nécessaire de

purifier la protéine sur une colonne de Sephadex G-100 ou de dénaturer celle-ci par l'urée 8 M selon les conseils d'HORTON et KOSHLAND (1965).

D'autre part, il peut y avoir substitution du noyau indole du tryptophane par un ou deux groupes 2-hydroxy 5-nitrobenzyle. Le dosage des résidus tryptophanyles non substitués par analyse de la composition en acides aminés permet d'infirmer ou de confirmer les résultats obtenus par spectrophotométrie et de déterminer le nombre de groupements fixés.

5.2.2. *Essai de substitution de l'élastase par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle*

L'élastase est moins stable que la chymotrypsine ou la trypsine aux pH acides (WASI et HOFFMAN 1968). Par conséquent, la réaction a été effectuée à pH 5,4. Cependant, à ce pH, le réactif se décompose spontanément (t 1/2 = 30 sec à pH 5,0 ou moins HORTON et KOSHLAND 1965) et par conséquent un large excès (1000 fois) dut être utilisé.

Le tableau 14 indique qu'aucun résidu tryptophanyle n'est modifié à ce pH, et l'enzyme reste pleinement active.

	Enzyme non traitée	Réaction à pH 5,4	Réaction à pH 4,2	Réaction à pH 3,0	SHOTTON D.M. (1970)
Trp	7,1	6,7	3,8	3,0	7
Lys	3,0	3,2	3,0	3,0	3
Arg	11,4	11,6	12,2	11,6	12
Activité U/Mg	12,7	13,7	7.10^{-3}	7.10^{-3}	13,4

Tableau 14 - Contenu en tryptophane et activité de l'élastase après réaction avec le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle à différents pH

En corrélation avec le changement de conformation de la molécule aux pH plus acides, l'activité décroît jusqu'à des valeurs négligeables et trois résidus tryptophanyles deviennent accessibles au réactif à pH 4,2.

A pH 3,0, le processus de déploiement de la protéine est encore incomplet car trois résidus tryptophanyles sur sept ne peuvent être substitués.

5.2.3. Identification du résidu tryptophanyle substitué dans la trypsine β

L'hydrolysat trypsique de la trypsine β S-sulfonée est chromatographié sur Sephadex G-25 (fig. 21 page suivante). La densité optique des fractions mesurée à 410 nm, permet de répartir grossièrement les peptides substitués en trois groupes : A, B et C.

Les peptides de faible poids moléculaire (B et C) sont purifiés par chromatographie sur papier et électrophorèse à haut voltage.

La fraction A, de haut poids moléculaire, hydrolysée successivement par la trypsine et la subtilisine permet d'isoler deux peptides D et F.

La composition en acides aminés de ces peptides correspond à la portion de séquence où se trouve le résidu tryptophanyle 199 substitué par un ou deux groupes 2-hydroxy 5-nitrobenzyle (tableau 15).

	199
Séquence	Leu-Gln-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Ser-Gly-Cys-Ala-Gln-Lys-
B	———————————————————
C	———————————————————
D	———————————————————
F	———————————————————

Tableau 15 - Comparaison des peptides substitués par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle avec la séquence entourant le tryptophane 199 de la trypsine

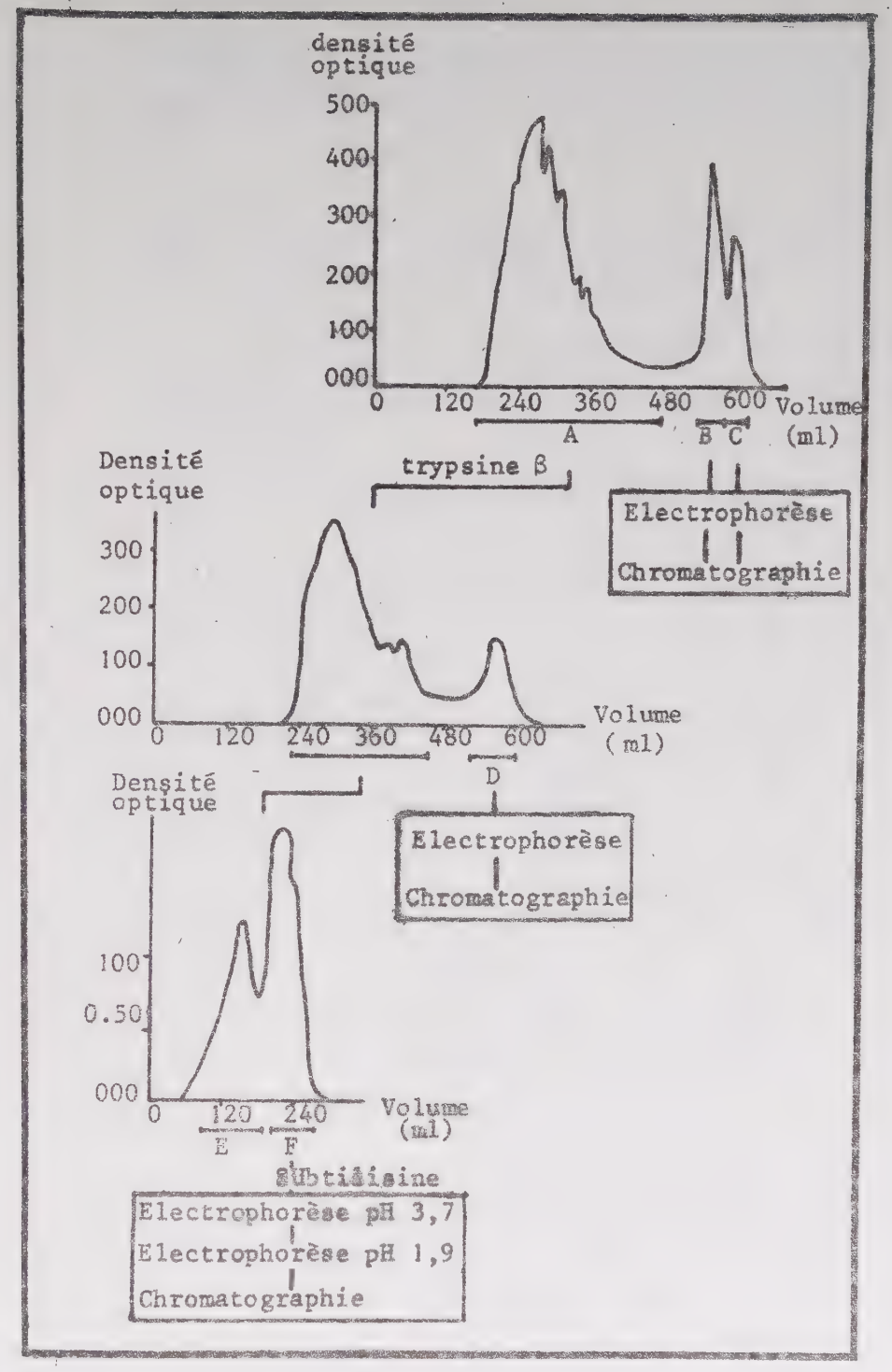


Fig. 21 - Purification des peptides substitués d'après IMHOFF et Coll. (1973)

Le fait que tous les peptides substitués isolés correspondent à la séquence autour du tryptophane 199 est une preuve supplémentaire que seul un résidu tryptophanyle des trypsines α et β est modifié par traitement avec le bromure de2-hydroxy 5-nitrobenzyle

5.2.4. Interaction des trypsines substituées avec l'inhibiteur trypsique du pancréas

Le résultat d'une chromatographie d'un mélange de trypsine β substituée avec l'inhibiteur est indiqué par la figure 22

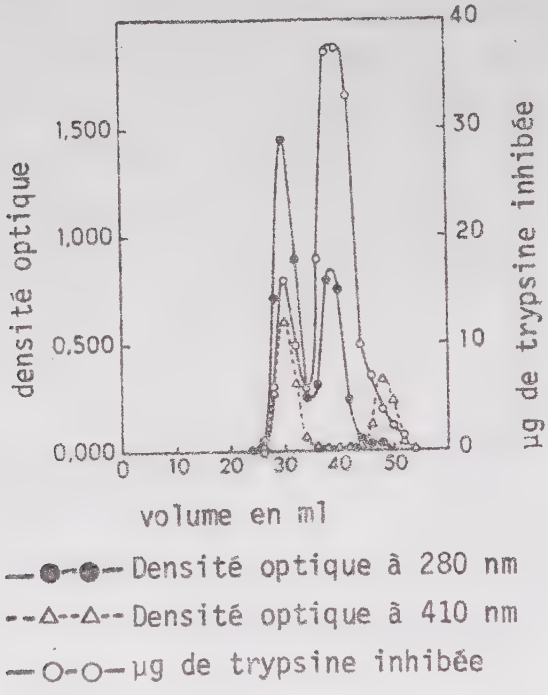


Fig. 22 - Chromatographie d'un mélange de trypsine β substituée et d'inhibiteur trypsique du pancréas sur Sephadex G-100

Le premier pic représente le complexe entre l'inhibiteur et l'enzyme substituée et le second l'inhibiteur en excès. L'analyse du contenu en acides aminés du premier pic correspond à un complexe dans le rapport 1:1 - inhibiteur : protéine substituée.

Le même résultat est obtenu avec la trypsine α. Ceci indique que la protéine substituée sur le résidu tryptophanyle 199 conserve sa capacité de fixer l'inhibiteur trypsique du pancréas, bien qu'elle ait perdu toute activité.

5.2.5. *Essai de substitution du complexe préformé inhibiteur trypsique du pancréas-trypsine*

Lorsque le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle est ajouté au complexe enzyme-inhibiteur préformé (enzyme : inhibiteur 1 : 4 mole à mole), l'analyse du contenu en acides aminés du complexe, isolé par chromatographie sur Sephadex G-25 puis G-100, indique qu'aucun résidu tryptophanyle n'est substitué, de même qu'aucune absorption à 410 nm du complexe ne peut être observée (tableau 16 voir page suivante).

Ceci indique que le résidu tryptophanyle 199 est protégé de la substitution par la présence de l'inhibiteur dans le complexe.

5.2.6. *Essai de substitution de la trypsine en présence de benzamidine*

La trypsine est traitée ainsi qu'il est indiqué dans le § *2.2.* mais en présence de benzamidine 10^{-3} M (MARES-GUIA et SHAW 1965).

Afin d'éliminer la possibilité que l'action même du réactif puisse être inhibée par la présence de la benzamidine dans le milieu et que l'action de la benzamidine est bien liée à l'intégrité de la molécule de trypsine, une expérience semblable a été réalisée avec la trypsine dénaturée (l'enzyme est dénaturée soit par précipitation avec l'acide trichloracétique 10 %, soit par le chauffage d'une solution d'enzyme à 100° durant 10 min.).

D'après les résultats consignés dans le tableau 16 (page suivante) aucun résidu tryptophanyle n'est substitué

Acides aminés	trypsines α et β	PTI	trypsine α substituée + PTI	trypsine α: PTI + HNB	trypsine : benzamidine + HNB	trypsine α dénaturée + benzamidine + HNB	trypsine α dénaturée + HNB
Lys	14	4	16,8	17,8	14,0	14,5	13,7
His	3	0	3,1	2,8	3,1	3,2	3
Trp	4	0	3,3	4,3	3,8	0,6	0
Arg	2	6	7,1	7,9	2,1	1,9	2,0

PTI : inhibiteur trypsique du pancréas HNB : bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyl

Tableau 16 - Contenu en acides aminés basiques et tryptophanes de la trypsine α substituée en présence et en absence soit d'inhibiteur trypsique du pancréas, soit de benzamidine (moles/moles d'enzyme)

en présence de benzamidine dans l'enzyme native, alors que les quatre tryptophanes de l'enzyme dénaturé réagissent avec le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle en présence ou en absence de benzamidine.

5.3. Discussion

La substitution d'un résidu tryptophanyle de la trypsine α et β par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle entraîne les conséquences suivantes :

- Perte totale des activités amidasique et estérasique de la protéine.
- Absence de modification du site de fixation de l'inhibiteur trypsique du pancréas.

Par ailleurs, la substitution ne peut avoir lieu dans deux cas :

- Fixation, préalablement à la substitution, d'un inhibiteur polypeptidique : l'inhibiteur trypsique du pancréas.
- Réaction en présence d'un inhibiteur de faible poids moléculaire:la benzamidine.

La perte d'activité enzymatique par substitution de résidus tryptophanyles par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle a été aussi observée pour une protéase de streptocoque et la papaïne (ROBINSON 1970 , MORIHARA et NAGAMI 1969).

Afin de faciliter la compréhension des résultats obtenus avec la trypsine β, ceux-ci seront confrontés aux effets de la même substitution réalisée dans notre laboratoire sur d'autres enzymes et zymogènes.

Par substitution d'un seul résidu tryptophanyle le chymotrypsinogène (Trp-215) et le trypsinogène (Trp-199) perdent leur activité potentielle (KATRUKHA et Coll. 1973 , KEIL-DLOUHA et KEIL 1972) quoique le mécanisme chimique de l'activation ne soit pas bloqué : le trypsinogène modifié, soumis aux conditions normales d'activation, libère l'hexapeptide terminal Val-Asp_4-Lys, mais sans qu'il y ait apparition d'activité (KEIL-DLOUHA et TONG, non publié).

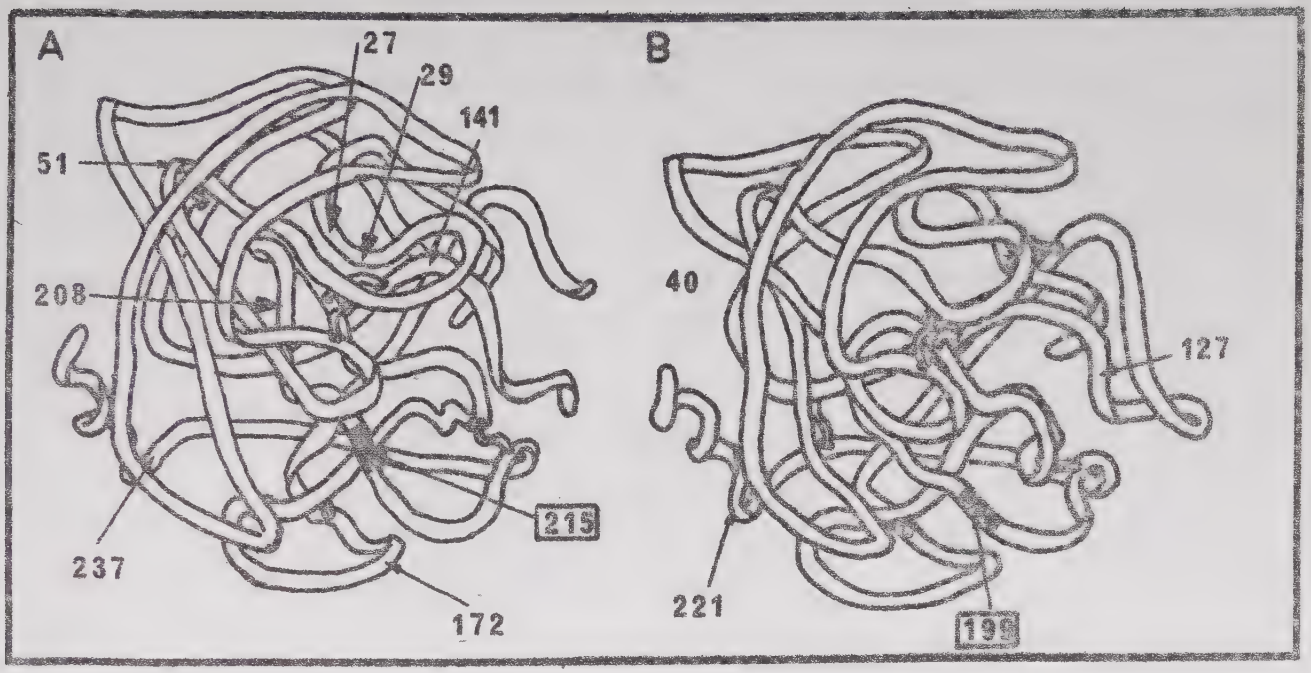


Fig. 23 - Emplacement des résidus tryptophanyles dans la chymotrypsine α (A) et la trypsine β (B)

De même, le trypsinogène, substitué sur le résidu tryptophanyle 199 perd la possibilité de former un complexe avec l'inhibiteur trypsique du pancréas, alors que l'enzyme correspondant, la trypsine α ou β, substituée sur le même résidu, bien qu'inactive, peut encore se lier à l'inhibiteur.

Il en est de même pour le chymotrypsinogène et la chymotrypsine. La substitution n'affecte pas les possibilités de formation du complexe, à ceci près que le zymogène natif ne peut, à la différence du trypsinogène, se lier à l'inhibiteur.

La substitution du résidu tryptophanyle 199 par le réactif de Koshland aurait un effet beaucoup plus prononcé que la formylation. Celle-ci entraînerait d'après COLETTI PREVIERO et Coll. (1969) la seule perte de l'activité estérasique par substitution de trois tryptophanes sur quatre.

D'après l'étude des spectres de diffraction aux rayons X,la similitude de structure de ces enzymes est bien établie. Le carbone α du résidu tryptophanyle 199 est situé dans la trypsine, à 6 Å du groupe hydroxyle de la sérine 183 en analogie avec le résidu tryptophanyl 215 et le résidu séryle 195 dans la chymotrypsine. Par conséquent, le lieu de substitution est dans le voisinage immédiat du site catalytique de l'enzyme. Cette proximité de conformation suggère un rôle spécifique au tryptophane 199 dans la fixation du substrat (KATRUKHA et Coll. 1973 , KEIL-DLOUHA et KEIL 1972).

Des études préliminaires, non rapportées ici, avaient permis de supposer que des liaisons, à la fois ioniques et de type hydrophobe participent à la fixation des substrats et des inhibiteurs par la trypsine.

Le résidu aspartyle 177 est supposé fixer la partie chargée positivement du ligand, alors que les groupes hydrophobes de différents acides aminés contribueraient à l'interaction hydrophobe. L'inhibition spécifique de la trypsine par la benzamidine s'explique aisément par la formule chimique de cet inhibiteur : deux parties distinctes, le groupe amidinium basique fixé par le résidu aspartyle 177, le noyau benzénique par les interactions hydrophobes.

Nos résultats indiquent que le résidu tryptophanyle 199 n'est pas substitué en présence de benzamidine. Cette perte de réactivité peut être expliquée par le masquage du groupe indole du tryptophane 199 par le noyau benzénique de la benzamidine dans le complexe inhibiteur enzyme : si l'on accepte l'hypothèse que le groupement basique de la benzamidine interagit avec le résidu aspartyle 177, alors la distance entre ce résidu et le groupe indole du tryptophane 199

est proportionnelle à la taille de la molécule d'inhibiteur. Le résultat obtenu est en accord avec les travaux de VILLANUEVA et HERKOVITS (1971), qui observent par la méthode de perturbation de solvant le masquage d'un résidu tryptophanyle par la benzamidine dans les trypsines α et β .

L'effet observé avec la benzamidine est d'autant plus manifeste dans le cas de l'inhibiteur trypsique du pancréas, dont la molécule dépourvue de tryptophane, est plus encombrante. Le résidu tryptophanyle 199 est alors complètement protégé de toute substitution, ceci est en accord avec le travail de STEINER (1964) indiquant la protection contre l'oxydation d'un résidu tryptophanyle par le N-bromosuccinimide dans le complexe enzyme : inhibiteur polypeptidique.

Par ailleurs, la perte d'activité estérasique et amidasique peut être assez facilement comprise sur la base de la structure tertiaire de la trypsine, comme de la chymotrypsine.

En effet, ainsi qu'il a été indiqué dans l'introduction, le site de fixation se présente comme une "poche" dont l'ouverture est constituée d'une part par les résidus Ser 188-Cys 189 et d'autre part par Trp 199-Gly 200. La distance entre ces deux parties de la chaîne polypeptidique est de 8 Å . On comprend donc que la substitution du résidu tryptophanyle par un groupe 2-hydroxy 5-nitrobenzyle puisse soit empêcher l'entrée de la partie chargée positivement du substrat, soit changer les conditions de l'environnement du site de fixation, de telle manière que le groupe chargé positivement du substrat ne puisse plus venir s'y fixer.

Cependant, la réactivité particulière d'un seul groupe indole sur les quatre que possède la molécule de trypsine ne peut être expliqué ainsi, selon VILLANUEVA et HERKOVITS (1971) trois résidus tryptophanyles sur quatre sont exposés au solvant. Une tentative d'explication peut être fournie par la comparaison de cette substitution par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle à celles obtenues avec les dérivés de la chymotrypsine α, réalisée par KEIL-DLOUHA et KEIL (1973). Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau 17.

Tableau 17 - Relations entre la réactivité du tryptophane et la fixation de l'inhibiteur trypsique du pancréas d'après KEIL-DLOUHA et KEIL (1973)

Protéine	Acide aminé modifié	Réactivité du tryptophane	Système de relais de charge intact	Formation de complexe avec PTI
Chymotrypsinogène	-	Trp 215 [1]	+ [2]	0 [3]
Chymotrypsine α	-	Trp 215 [4]	+ [5]	+ [6]
Trypsinogène	-	Trp 199 [7]		+ [3]
Trypsine β	-	Trp 199 [8]	+ [9]	+ [6]
DIP-chymotrypsine α	Ser 195	0 [4]	0	0 [4]
PMS-chymotrypsine α	Ser 195		0	0 [4]
Anhydrochymotrypsine α	Ser 195	0 [4]	0	0 [1]
TPCK-chymotrypsine α	His 57	0 [4]	0	-

PTI : Inhibiteur trypsique du pancréas - DIP : Diisopropylphosphate
PMS : Phénylméthylsulfone TPCK : Tosylphénylchlorméthylcétone

1) KATRUKHA et Coll. (1973) - 2) FERSHT et SPERLING (1973) - 3) DLOUHA et KEIL (1969)
4) KEIL-DLOUHA et KEIL (1973) - 5) BLOW et Coll. (1969) - 6) WA et LAKOWSKI (1955)
7) KEIL-DLOUHA et KEIL (1972) - 8) IMHOFF et Coll. (1973) - 9) STROUD et Coll.(1971)

Les trois formes modifiées de la chymotrypsine α soit DIP chymotrypsine, PMS-chymotrypsine et anhydrochymotrypsine, ne peuvent plus être substituées par le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle. Ceci peut être dû à l'encombrement des groupes substituants dans le cas de DIP-chymotrypsine et PMS-chymotrypsine, confirmé par l'impossibilité de former un complexe avec l'inhibiteur trypsine du pancréas. Cela ne peut être le cas pour l'anhydrochymotrypsine, où le résidu séryle actif 195 du site catalytique, au lieu d'être substitué par un groupement de fort encombrement, perd au contraire le radical hydroxyle pour devenir une déhydroalanine ; le complexe peut se former alors que la substitution d'un résidu tryptophanyle est impossible.

Ainsi que le rapportent WOOTON et HESS (1960), la substitution de la chymotrypsine par le diisopropylfluorophosphate, aussi bien que son acylation, provoque un réarrangement du site actif impliquant une interaction importante de celui-ci avec un résidu tryptophanyle.

Il est cependant intéressant de noter que la perte du système de relais de charge du site actif entre les résidus histidyle 57, séryle 195 et aspartyle 102, par modification du résidu séryle en déhydroalanine, coïncide avec la perte de réactivité du résidu tryptophanyle. Il est possible de penser que la réactivité particulière du tryptophane 199 de la trypsine, 215 de la chymotrypsine est relié à l'activité fonctionnelle de l'enzyme elle-même.

Ceci peut recevoir une confirmation indirecte par l'essai de substitution effectuée avec l'élastase. Le résidu tryptophanyle qui, dans la chymotrypsine se trouve impliqué par la réaction avec le bromure de 2-hydroxy 5-nitrobenzyle, est remplacé par un résidu phénylalanyle (tableau 12). On ne peut alors observer la modification d'aucun autre résidu tryptophanyle par le réactif, tandisqu'un changement de pH, conduisant à une conformation différente permet la substitution d'autres résidus tryptophanyles ce qui laisse supposer que le résidu tryptophanyle 215 dans la chymotrypsine ou 199 dans la trypsine occupe une position privilégiée.

6 - Conclusions

6. CONCLUSIONS

Le problème de la relation existant entre la modification d'un résidu d'acide aminé sur la séquence d'une protéine et les répercussions sur l'activité et la structure de celle-ci a été examiné d'après les deux aspects envisagés au début de cette étude :

1 - Activité de l'enzyme : catalyse, fixation de substrats ou d'inhibiteurs, spécificité.

2 - Comparaison des résultats obtenus pour différentes enzymes homologues.

Nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de deux résidus aromatiques, tyrosine et tryptophane, sur la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Nous pouvons constater une graduation dans les effets observés :

- Perte complète d'activité catalytique : substitution d'un résidu tryptophanyle de la trypsine et de la chymotrypsine.

- Variation des caractéristiques cinétiques de l'activité enzymatique : modification de deux résidus tyrosyles de la chymotrypsine α .

- Invariance des activités : substitution de quatre résidus tyrosyles de la trypsine β et de deux résidus tyrosyles de la chymotrypsine δ , ou absence de résidu tryptophanyle réactif dans l'élastase.

Ces différences peuvent être interprétées d'après les données cristallographiques publiées sur ces trois enzymes. Par ailleurs, nous devons tenir compte des différences observées entre les propriétés de ces protéines sous forme cristalline et en solution.

L'étude aux rayons X du cristal de chymotrypsine α ne permet pas d'évaluer le rôle du résidu tyrosyle 146. Celui-ci interagit avec le résidu séryle 195 du centre actif de l'autre molécule à l'intérieur du dimère asymétrique formé dans le cristal.

Il est ainsi placé dans une position fixe et cette partie de l'enzyme a vraisemblablement une conformation différente dans l'enzyme en solution.

De même, l'interaction de la chymotrypsine α avec le N-formyl-L-tryptophane n'indique pas d'interaction entre cet inhibiteur et Tyr 146, quoique le résidu Tyr 146 de la molécule opposée soit déplacé par la fixation de l'inhibiteur (BLOW et Coll. 1972).

Le résidu tyrosyle 146 ne semble pas indispensable pour la stabilité de la chymotrypsine α car son élimination n'entraîne pas de perturbation de la transition alcaline de l'enzyme (GHELIS 1971), mais l'abaissement d'activité qui s'en suit suggère néanmoins que l'intégrité de la structure dans cette région de la molécule est indispensable pour l'activité.

En solution, la nitration de ce résidu tyrosyle 146 provoque des variations des caractéristiques cinétiques de la chymotrypsine K_m et K_d, constante de dissociation de l'enzyme avec l'inhibiteur trypsique du pancréas.

Quoique relativement éloigné du site catalytique de la chymotrypsine α, la modification du résidu tyrosyle 146 entraîne dans la chaîne polypeptidique des répercussions qui se manifestent au niveau du site actif de l'enzyme.

La comparaison des spécificités et des spectres de différence des deux chymotrypsines α nitrée et δ indique un rapprochement des conformations du site de fixation de la chymotrypsine α par nitration des résidus tyrosyles. De même, la chymotrypsine α nitrée acquiert la même possibilité que la chymotrypsine δ à fixer le substrat à pH alcalin.

Par contre la même nitration est réalisée sur l'enzyme homologue, la chymotrypsine δ dans laquelle le résidu tyrosyle 146 est lié dans la chaîne peptidique, n'entraîne aucun changement perceptible d'activité.

Les études cristallographiques aux rayons X des chymotrypsines α et δ n'ont pu mettre en évidence des différences notables de

structure tertiaire. La seule différence entre les chymotrypsines réside dans la coupure de la liaison peptidique Tyr 146-Thr 147 avec perte du dipeptide Thr 147-Asn 148.

Le rapprochement des structures, suggéré par l'ensemble des résultats, peut être dû à une modification de la position du noyau phénolique du résidu tyrosyle 146 lors de la nitration. Une telle réorientation du groupe phényle est envisagée par MAVRIDIS et Coll. (1974) lors du passage de pH 5,4 à 8,3 des cristaux de chymotrypsine α. Le noyau du résidu tyrosyle 146 se déplace de l'interface entre les deux unités du dimère vers la zone plus hydrophobe du monomère.

La même absence d'effet de la nitration de résidus tyrosyles peut être observée lors de l'action du tétranitrométhane sur la trypsine β , formé d'une seule chaîne polypeptidique. Quatre résidus tyrosyles sont nitrés. Aucun changement d'activité, estérasique ou protéolytique, n'est constaté. L'absence de modification de spécificité en qualité ou en quantité laisse supposer une invariance de la structure tertiaire, tout au moins du site actif, de la trypsine β substituée par rapport à celle de la protéine native.

Il ne peut pourtant être affirmé que les résidus tyrosyles impliqués dans la substitution n'ont aucun rôle dans le maintien de la conformation générale de la protéine, ou particulière du site actif. La nitration peut n'avoir qu'un effet mineur sur les caractéristiques du résidu tyrosyle lié à une chaîne polypeptidique par rapport à la tyrosine libre.

Les études cristallographiques de la trypsine β ne montrent pas de changement essentiel de conformation avec les chymotrypsines α ou δ(BODE et SCHWAGER 1975). Leurs séquences présentent cependant de notables différences, parmi lesquelles le nombre et la position des résidus tyrosyles, ou tryptophanyles.

La modification des résidus tyrosyles ne provoque pas de variation de l'activité enzymatique de la chymotrypsine δ, dont dérive la chymotrypsine α ni de la trypsine β. La substitution

d'un seul résidu tryptophanyle par le réactif de Koshland supprime l'activité catalytique des deux enzymes ; seule est conservée la possibilité de fixer l'inhibiteur trypsique du pancréas. Le seul résidu tryptophanyle 199 pour la trypsine, 215 pour la chymotrypsine est directement impliqué dans l'activité de l'enzyme. Il est protégé de toute substitution par la fixation préalable d'un inhibiteur à l'enzyme.

La structure tertiaire de la trypsine β ne permet pas de soupçonner le rôle du résidu tryptophanyle 199. Sa position au sein de l'enzyme ou son exposition au solvant ne change pas au cours de l'activation du zymogène car il peut être substitué réactif de Koshland dans le précurseur de la trypsine (KEIL-DLOUHA et KEIL - 1972). Il est d'autre part le seul résidu tryptophanyle substituable que ce soit dans la trypsine ou dans la chymotrypsine où le nombre de tryptophanes exposés au solvant est respectivement de trois sur quatre et trois sur huit résidus. Dans l'élastase, enzyme de structure tertiaire semblable à la chymotrypsine, le remplacement par un résidu phénylalanyle du résidu tryptophanyle substituable annule toute substitution.

La modification des résidus tyrosyles ou d'un résidu tryptophanyle a les mêmes effets sur les deux enzymes protéolytiques : chymotrypsine et trypsine, confirmant ainsi par des méthodes chimiques les conclusions des études cristallographiques.

La modification des résidus tyrosyles ne semble pas par ailleurs, entraîner de changements de type "tout ou rien" dans l'activité enzymatique des protéines substituées. L'effet de la nitration est partiel pour des enzymes aussi différentes que la thrombine, la carboxypeptidase A ou le lysozyme (LUNDBLAD et Coll. 1971, RIORDAN et Coll. 1967, ATASSI et Coll. 1969), et seul un abaissement relativement faible de l'activité de ces enzymes est constaté. La substitution de résidus tryptophanyles provoque, par contre, dans les exemples fournis par la bibliographie, une chute

plus brutale de l'activité, de 90 à 95 % de l'activité initiale pour la proteinase de streptocoque (ROBINSON 1970), le lysozyme (VERONESE et Coll. 1972) ou la pepsine (DOPHEIDE et JONES 1968) à une perte totale de toute activité pour la désoxyribonucléase (POULAS et PRICE 1971) et la transcetolase (HEINRICH et Coll. 1972). Notre étude du rôle des deux acides aminés aromatiques, tyrosine et tryptophane sur les protéases pancréatiques confirme cette impression générale.

7 - BIBLIOGRAPHIE

D'ALBIS A. et BECHET J.J.
Biochim. Biophys. Acta 140 (1967) 435-458

AMES G.F.L.
J. Biol. Chem. 249 (1974) 634-644

ATASSI M.Z. et HABEEB A.F.S.A.
Biochemistry 8 (1969) 1385-1393

BARMAN T.E. et KOSHLAND D.E. Jr
J. Biol. Chem. 242 (1967) 5771-5776

BISERTE G. et OSTEUX R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 33 (1951) 50-63

BLOW D.M., WRIGHT C.S., KUKLA D., RUHLNAANN A., STEIGEMANN W. et HUBER R.
J. Mol. Biol. 69 (1972) 137-144

BODE W. et SCHWAGER P.
J. Mol. Biol. 98 (1975) 693-717

BOYD N.D. et SMITH D.B.
Can. J. Biochem. 49 (1971) 154-161

BRENNER M., NIEDERWIESER A. et PATAKI G.
in "Thin layer chromatography" (1966)
(Stahl E. ed.) 730-780, Springer Verlag
Berlin-Heidelberg-New York

BRUICE T.C., GREGORY M.J. et WALTERS S.L.
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 1612-1619

CHASE T. Jr. et SHAW E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 (1967) 508-514

COLETTI-PREVIERO M.A., PREVIERO A., ZUCKERLAND E.
J. Mol. Biol. 39 (1969) 493-501

CUATRECASAS P., WILCHEK M. et ANFINSEN C.B.
Biochemistry 61 (1968) 636-643

CUNNINGHAM L.
Comp. Biochem. 16 (1965) 85

DELAAGE M., ABITA J.P. et LADZUNSKI M.
Eur. J. Biochem. 5 (1968) 285-293

DELAAGE M. et LADZUNSKI M.
Biochim. Biophys. Acta 105 (1969) 523-540

DELAAGE M. et LADZUNSKI M.
Biochim. Biophys. Acta 105 (1969) 541-561

DIXON G.H. et NEURATH H.
J. Biol. Chem. 225 (1957) 1049-1059

DEVENYI T.
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung 4 (1969) 297-299

DLOUHA V., KEIL B. et SORM F.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31 (1968) 66-76

DOPHEIDE T.A.A.et JONES W.M.
J.Biol. Chem. 243 (1968) 3906-3911

DUBE S.K., ROHOLT O.A. et PRESSMAN D.
J. Biol. Chem. 241 (1966) 4465-4469

EISENTAHL R. et CORNISH-BOWDEN A.
Biochem. J. 139 (1974) 715-720

ERLANGER B.F., KOKOWSKY M. et COHEN W.
Arch. Biochem. Biophys. 95 (1961) 271-278

FERSHT A.T.
J. Mol. Biol. 64 (1972) 497-509

FOUCAULT G.
Thèse de Doctorat de troisième cycle (1972)
Université de Paris XI, Orsay

FREER S.T., KRAUT J., ROBERTUS J.D., WRIGHT H.T. et XUONG Ng.H.
Biochemistry 9 (1970) 1997-2009

GHELIS C.
Thèse de Doctorat ès Sciences (1971)
Université de Paris XI, Orsay

GLAZER A.N. et SANGER F.
Biochem. J. 90 (1964) 92-98

GORBUNOFF M.J.
Biochemistry 8 (1969) 2591-2598

HACHIMORO Y., KURIHARA K., HORINISHI K., MATOUSHIMA A. et SHIBATA K.
Biochim. Biophys. Acta 105 (1965) 167-177

HARTLEY B.S. et SHOTTON D.M.
"The Enzymes" (1971) p. 323
Academic Press, New York, Londres

HAVSTEEN B.H. et HESS G.P.
J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 448-452

HEINRICH C.P., NOACK K. et WISS O.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49 (1972) 1427-1432

HENDERSON R., WRIGHT C.S., HESS G.P. et BLOW D.M.
Symposia on quantitative Biology Vol. 36 (1971) p. 63

HESS G.P., Mc CONN J.K.E. et Mc CONKEY G.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 257 (1976) 89-137

HIMOE A., PARKS P.C. et HESS G.P.
J. Biol. Chem. 242 (1967) 919-929

HOLT J.C., MELOUN B. et SORM F.
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 37 (1972) 1401-1407

KEIL-DLOUHA V. et KEIL B.
J. Mol. Biol. 67 (1972) 495-505

KEIL-DLOUHA V. et KEIL B.
J. Mol. Biol. 81 (1973) 391-394

KEIL B., PRUZIK Z. et SORM F.
Biochim. Biophys. Acta 78 (1963) 559-561

KELLERSHOHN N.
Thèse de Doctorat de troisième cycle (1970)
Université de Paris XI, Orsay

KEENER R.A., WALSH K.A. et NEURATH H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 353-360

KOSHLAND D.E. Jr., HORKHANIS Y.D. et LATHAM H.G.
J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1448-1450

KRAUT J., WRIGHT H.T., KELLERMAN M. et FREER S.T.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58 (1967) 304

KRIEGER M., KAY L.M. et STROUD R.M.
J. Mol. Biol. 83 (1974) 209-230

KUMAR S. et HEIN G.E.
Anal. Biochem. 30 (1969) 203-211

KUMAR S. et HEIN G.E.
Biochemistry 9 (1970) 291-297

LABOUESSE J. et GERVAIS M.
Eur. J. Biochem. 2 (1967) 215-223

LIU T.H. et CHANG Y.H.
J. Biol. Chem. 246 (1971) 2842-2848

LUNDBLAD R.L. et HARRISON J.H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 1344-1349

MARES-GUIA M. et SHAW E.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 1579-1585

MATTHEWS B.W; SIGLER P.B., HENDERSON R. et BLOW D.M.
Nature 214 (1967) 652-656

MAVRIDIS A., TULINSKY A. et LIEBMAN M.N.
Biochemistry 13 (1974) 3661-3666

MIKES O.
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 22 (1957) 831-849

MIKES O., HOLEYSOVSKY V., TOMASEK V. et SORM F.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 (1966) 346

MILLER D.D., HORBETT T.A. et TELLER D.C.
Biochemistry 10 (1971) 4641-4648

MITCHELL W.M.
Biochim. Biophys. Acta 147 (1967) 147-171

MORIHARA K. et NAGAMI K.
J. Biochem. Tokyo 65 (1969) 321-323

NARITA K.
"Protein sequence determination" (1970)
(Needleman S.B. ed.) 25-29, Springer-Verlag
Berlin-Heidelberg-New York

NEIL G.L., NIEMANN C. et HEIN G.E.
Nature 210 (1966) 903-907

OPPENHEIMER H.L., LABOUESSE B. et HESS G.P.
J. Biol. Chem. 241 (1966) 2720-2730

PECHERE J.F., DIXON G.H., MAYBURY R.H. et NEURATH H.
J. Biol. Chem. 233 (1958) 1363-1372

POULOS T.L., PRICE P.A.
J. Biol. Chem. 246 (1971) 4041-4045

RIORDAN J.F., SOKOLOVSKY M. et VALLEE B.L.
J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 4104-4105

RIORDAN J.F., SOKOLOVSKY M. et VALLEE B.L.
Biochemistry 6 (1967) 358-361

RIORDAN J.F., WACKER W.E.C. et VALLEE V.L.
Biochemistry 4 (1965) 1758-1765

ROBINSON G.W.
J. Biol. Chem. 245 (1970) 4832-4841

ROSEN H.
Arch. Biochem. Biophys. 67 (1957) 10-15

SCHOENBAUM G.R., ZERNER B.et BENDER M.L.
J. Biol. Chem. 236 (1961) 2930-2935

SCHROEDER D.D. et SHAW E.
J. Biol. Chem. 243 (1968) 2943-2949

SHAW E. et GLOWER G.
Arch. Biochem. Biophys. 139 (1970) 298-305

SHLYAPNIKOV S.V., MELOUN B., KEIL B. et SORM F.
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 33 (1968) 2292-2298

SHOTTON D.M.
"Methods in Enzymology" Vol. 19, p. 113-140
(1970) Academic Press, New York-London

SHOTTON D.M. et HARTLEY B.S.
Nature 225 (1970) 802-806

SIGLER P.B., BLOW D.M., MATTHEWS B.W. et HENDERSON R.
J. Mol. Biol. 35 (1968) 143-164

SOKOLOVSKY M ., HARELL D. et RIORDAN J.F.
Biochemistry 8 (1969) 4740-4745

SOKOLOVSKY M. et RIORDAN J.F.
FEBS-Letters 9 (1970) 239-241

SOKOLOVSKY M., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L.
Biochemistry 5 (1966) 3582-3589

SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S.
Anal. Biochem. 30 (1958) 1190-1206

STEINER R.F.
Biochemistry 5 (1966) 1964-1966

STEITZ T.A., HENDERSON R. et BLOW D.M.
J. Mol. Biol. 46 (1969) 337-348

STROUD R.M., KAY L.M. et DICKERSON R.E.
J. Mol. Biol. 83 (1974) 185-208

URIEL J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 8-9 (1966) 969-982

VALENZUELA P. et BENDER M.L.
Biochemistry 9 (1970) 2440-2446

VERONESE F.M., BOCCU E. et FONTANA A.
FEBS-Letters 21 (1972) 277-280

VILLANUEVA G.B. et HERSKOVITS T.T.
Biochemistry 10 (1971) 4589-4594

VINCENT J.P. et LAZDUNSKI M.
Eur. J. Biochem. 38 (1973) 365-372

VINCENT J.P., LAZDUNSKI M. et DELAAGE M.
Eur. J. Biochem. 12 (1970) 250-257

WALSH K.A., KAUFMAN D.L., SAMPATH KUMAR K.S.V. et NEURATH H.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.51 (1964) 301

WASI S. et HOFMANN T.
Biochem. 106 (1968) 926-927

WILCOX P.E.
Fed. Proc. 16 (1958) 270

WILLIAMS J. et LOWE J.M.
Biochem. J. 121 (1971) 203-209

WRIGHT H.T., KRAUT J. et WILCOX P.E.
J. Mol. Biol. 37 (1968) 363-366

WOOTON J.F. et HESS G.P.
Nature 188 (1960) 726-728

ZANETTA J.P., VINCENDON G., MANDEL P. et GOMBAS G.
J. Chromatog. 51 (1970) 441-458

ZERNER B. et BENDER M.L.
J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3669-3674

WILLIAMS J. et LOWE J.M.
Biochem. J. 121 (1971) 203-209

WRIGHT H.T., KRAUT J. et WILCOX P.E.
J. Mol. Biol. 37 (1968) 363-366

WOOTON J.F. et NESS G.P.
Nature 188 (1960) 726-728

ZANETTA J.P., VINCENDON G., MANDEL P. et GOMBAS G.
J. Chromatog. 51 (1970) 441-452

ZERNER B. et BENDER M.L.
J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3669-3674